

HEPARINÜBERWACHUNG

VERGLEICH VON HEPARIN - PLASMABESTIMMUNG

UND FUNKTIONELLEN GERINNUNGSTESTEN

JEAN - MARIO PALLAST

1984

*Diss.
München
1985*

Aus der Medizinischen Klinik III der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Wilmanns)

HEPARINÜBERWACHUNG
VERGLEICH VON HEPARIN-PLASMASPIEGELBESTIMMUNG UND
FUNKTIONELLEN GERINNUNGSTESTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

28.1.84 : geprüft durch Prof. Dr. W. Wilmanns
vorgelegt von

Jean-Mario Pallast
aus Bruchsal

München 1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Hiller
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Wilmanns
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der medl. Prüfung : 23.1.85

Für die Überlassung des Themas der
vorliegenden Arbeit möchte ich

Prof. Dr. E. Hiller

besonders danken.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	3
Zur Biochemie, Pharmakokinetik und haemostaseologischer Wirkung von Heparin	
2. Fragestellung	19
3. Material und Methoden	20
3.1 Normalplasma	20
3.2 Blutentnahme beim Patienten	20
3.3 Thrombinzeit	21
3.4 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit	22
3.5 Fibrinogenbestimmung	23
3.6 Heparin- und Antithrombin-III-Bestimmung	25
3.6.1 Anwendung und Funktion des Gerätes	25
3.6.2 Eichung und Vorbereitung des Gerätes zur Heparin-AT-III-Bestimmung	27
3.6.3 Reagenzien zur Heparin-AT-III-Bestimmung	28
3.6.4 Messung der Heparinaktivität im Plasma mit synthetischem Substrat	30
3.6.5 Material zur Durchführung des Tests	31
3.6.6 Ausführung	32
3.6.7 Erstellung der Heparin-Bezugskurven	32
3.6.8 Instrumentenkontrolle und Eichungstechnik	42
3.6.9 Messung der Heparinstandards, der Heparincontrol und der Patientenplasmen	44
3.6.10 Messung der AT-III-Aktivität im Plasma mit synthetischem Substrat	46
3.6.11 Material zur Durchführung der Tests	46
3.6.12 Ausführung	47
3.6.13 Instrumentenkontrolle und Eichungstechnik	49
3.6.14 Messung der Plasmaproben	51

	Seite
4. Patienten	53
5. Ergebnisse	55
5.1 Heparinstandardkurven	55
5.2 Statistische Analyse	57
5.3 Heparin-aPTT-Beziehung	58
5.4 Heparin-Thrombinzeit-Beziehung	61
5.5 Antithrombin III	63
5.6 Fibrinogen	63
5.7 Haemodialyse	64
5.8 Extrakorporaler Kreislauf	66
5.9 Kosten der Heparin- und Antithrombin- III-Bestimmung	70
6. Diskussion	71
7. Zusammenfassung	77
8. Literaturverzeichnis	79

1. EINLEITUNG

Zur Biochemie, Pharmakinetik und haemostaseologischer Wirkung von Heparin

Auf der Suche nach gerinnungsfördernden Substanzen entdeckte McLean (1916) in einigen Geweben Substanzen mit stark gerinnungshemmenden Aktivitäten. Er isolierte eine Substanz, die man Cephalin nannte (57). Howell, Professor am Physiologischen Institut der John Hopkins Medical School, glaubte, daß Cephalin jenes Antithrombin sei, das Thrombin in seiner Aktivität hemmen würde. 1919 änderten Howell und sein Assistent Holt den Namen Cephalin in Heparin, da diese Substanz erstmalig in Hundeleber nachgewiesen wurde. Howell gelang es, diese Verbindung in einem höheren Reinheitsgrad zu isolieren als zuvor McLean. Der Reinheitsgrad war jedoch für die Therapie nicht ausreichend. Auch konnte die gerinnungshemmende Aktivität noch nicht definiert werden (37). Jorpes gelang es, Heparin zu reinigen und chemisch zu charakterisieren (44). Heparin ist ein saures Polysaccharid mit positiv optischer Rotation. Es besteht aus 1,4-glykosidischen Bindungen (Abb. 1). Heparin ist keine chemisch definierte Substanz, sondern ein inhomogenes Gemisch von Mukopolysaccharidpolyschwefelsäureestern (44) verschiedener Kettenlänge und Sulfurierungsgrade (60), deren biologische Wirksamkeit große art- und organspezifische Unterschiede aufweist (40, 53).

Kiss, Hoffmann und Markwardt weisen darauf hin, daß die chemische Struktur von Heparin mit einer Formel nicht exakt wiederzugeben sei, da es aufgrund seiner Heteropolysaccharidnatur räumlich unübersichtlich strukturiert ist (36, 46).

Nach Jaques (1979) ist Heparin als linear anionischer Polyelektrolyt zu definieren und besteht aus Polysaccharidketten mit vielfach sauren Gruppen ohne wesentlichen Proteingehalt (39). Ein charakteristisches Heparin-Hexasaccharid besteht aus einer Kette von 6 Zuckern, nämlich 3 Molekülen 2,6-Disulfoglukosamin, alternierend mit (z.T. sulfoniertem) Glukuronat, sowie einer korrespondierenden Menge von ca. 12 % Na^+ oder Ca^{2+} als Kationen und Cl^- und SO_4^{2-} als Anionen. Daneben enthalten die polymeren Ketten noch verschiedene andere Zucker, die in einer Frequenz von 1 : 12 oder darunter vorliegen (14), (Abb.2).

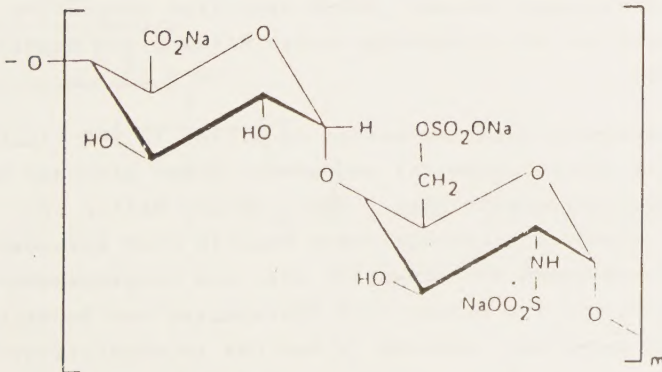
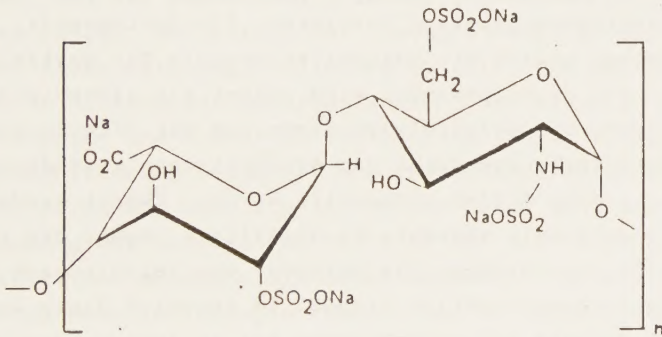


Abb. 1 Struktur des Heparins $n = m$, $n + m = 8 - 15$ in den meisten Heparinpräparaten (nach Kiss, aus Hoffmann, Markwardt 1979)

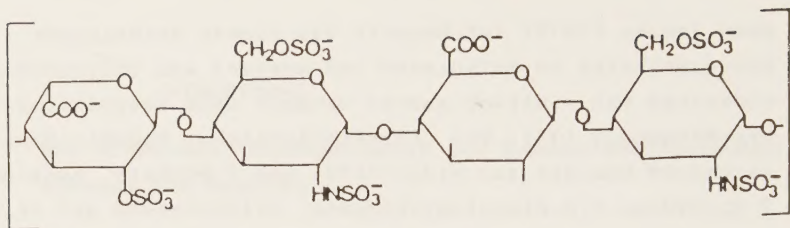


Abb. 2 Dargestellt ist das sich in den Polysacchariden eines Heparinmoleküls wiederholende Tetrasaccharid: Glukuronsäure, Glukosamin, Iduronsäure und Glukosamin (aus Harenberg 1983)

Heparin läßt sich aus Leber und Haut, Lunge und Darmmukosa verschiedener Spezies isolieren. Als Syntheseort beim Menschen gelten die basophilen Granula der Mastzellen (29). Das Heparinmolekül wird zuerst als alternierendes Copolymer von N-Acetylglukosamin und der Glukuronsäure synthetisiert. Die Reihe der synthetischen Veränderungen kann in drei Stufen eingeteilt werden. Zuerst werden die Glukosaminreste verschieden acetyliert, wobei die ungeschützten Aminogruppen als Akzeptor von Sulfatresten in einer Übertragungsreaktion dienen. Im Anschluß daran werden Glukuronreste auf verschiedene Art zu Iduronsäure epimerisiert. Schließlich werden die Glukosamin- und die Iduronsäurereste mit Sauerstoff verbunden (46). Markwardt weist darauf hin, welche wichtige funktionelle Bedeutung der N-Sulfatgruppe zukommt, deren selektive Abspaltung zum Verlust der antikoagulatorischen Wirkung von Heparin führt (36).

Für kommerzielle Heparine werden im Mittel 10.500 - 12.000 Dalton als Molekulargewicht angegeben, wobei sich der Molekulargewichtsbereich über 3.000 - 30.000 Dalton erstreckt. Kommerziell erhältliches Heparin wird entweder aus der Darmmukosa des Schweines oder aus Lungengewebe des Rindes gewonnen (in Europa wird überwiegend das Schweineheparin verwendet, während in den USA im wesentlichen Rinderheparin zum Einsatz kommt). Die antikoagulatorische

Aktivität dieser Produkte wird pro Gewichts- bzw. Massenangabe in vitro im Schafblut nach "US-Pharmakopöe-Einheiten" standardisiert. 1 USP definiert eine internationale Einheit (IE) als die biologische Aktivität, mit der eine Stunde hindurch die Gerinnung von 1,0 ml citratantikoagulierten Schafsblutes trotz Rekalkifizierung verhindert wird (29).

Heparin ist im Gegensatz zu den indirekten Antikoagulantien, wie den Cumarinen, wegen seiner direkten Antithrombin- und Antithromboplastinwirkung das Mittel der ersten Wahl bei der Behandlung frischer thromboembolischer Erkrankungen. Der Erfolg der Therapie hängt in erster Linie von einer wirksamen Dosierung ab (31). Die gerinnungshemmende Wirkung des Heparins besteht vor allem in einer Thrombin- und Faktor-Xa-Inhibierung (Abb. 3). Die Thrombininhibierung verzögert die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin und hebt sie in höheren Dosen ganz auf. Die Hemmung des aktiven Faktors X (F Xa) ist besonders für die Thromboseprophylaxe bedeutungsvoll. Von den verschiedenen Heparinwirkungen scheint der beschleunigende Effekt auf die Inaktivierung von Thrombin und Faktor Xa durch Antithrombin III die größte praktische und klinische Konsequenz zu besitzen (7).

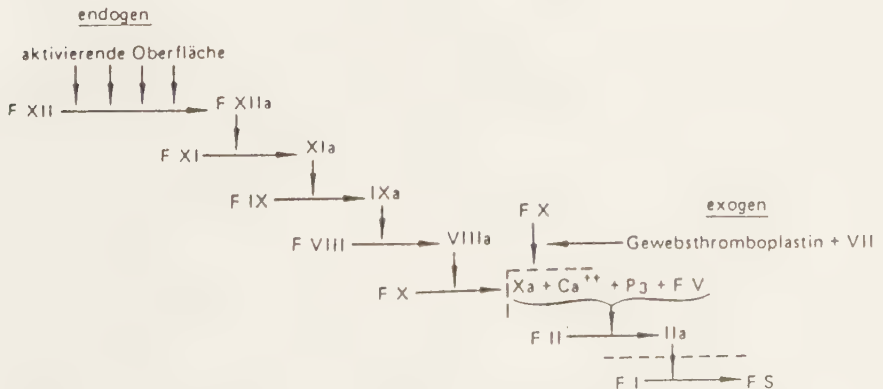


Abb. 3 Die beiden wichtigsten Angriffspunkte des Heparins im Gerinnungsprozeß.

-----Angriffspunkte von Heparin

(modifiziert nach Bruhn, Niedrig dosiertes Heparin 1980)

Die kommerziellen Heparine beeinflussen in vivo mehr als 50 Enzymsysteme, da Heparin mit ihnen Komplexe bildet, sie stabilisiert oder destabilisiert und häufig ihre Funktion in weit geringeren Konzentrationen beeinflusst als zur Erzielung antikoagulatorischer Effekte notwendig ist (21, 42). Der Einfluß von Heparin auf Plättchenfunktion und Fibrinolyse ist komplex und umstritten (36, 86). Lipolytische Effekte des Heparins können zusätzlich mittelbar das Gerinnungssystem beeinflussen (36).

Bei der Interpretation der Dosis-Wirkungsbeziehung ist wesentlich, daß Heparin in vivo wie in vitro als anionisches Polyelektrolyt Komplexe bildet und speziell mit basischen Proteinen, wie sie aus Zellen des Blutes freigesetzt werden (23), und mit zahlreichen Arzneimitteln und Alkaloiden reagiert oder mit ihnen Komplexe bildet. Diese Komplexe sind zumeist nicht mehr antikoagulatorisch aktiv. Die Bindungsaffinität der verschiedenen Substanzen zum Heparin ist am besten mit der elektrischen Nettoladung zu definieren und korreliert somit naturgemäß nicht unmittelbar mit der antikoagulatorischen Wirksamkeit des Heparins (88).

Weitere Faktoren, welche die antikoagulatorische Heparinaktivität beeinflussen, sind das Molekulargewicht, strukturelle Besonderheiten des Moleküls, Kettenlänge, Verunreinigungen von begleitenden Polypeptiden, Proteinen und Polysacchariden (46). Bei der pharmakologischen Herstellung von Heparin zeigen sich beträchtliche Unterschiede im Anteil der Glukuronsäure zur Iduronsäure, Änderungen im Anteil von N-Sulfatester wie auch unterschiedliche N-Acetylierung (50, 11, 13). Es ist nachgewiesen, daß eine Abhängigkeit des gerinnungshemmenden Effekts von der Molekulargewichtsverteilung der Heparingemische besteht, wobei mit zunehmender Reduktion im Bereich von 3.000 - 6.000 Dalton ein Anstieg der Hemmwirkung auf die Vorphase der Gerinnung, gemessen an der Inhibitor-Qua-

lität des Plasmas gegenüber Faktor Xa, resultiert. Dieser Effekt ist bei Darmmukosaheparinen deutlich stärker als bei Lungenheparinen. Die Wirkung auf Thrombin hinsichtlich der Molekulargewichtsverteilung, gemessen mit der Thrombinzeit, verhält sich umgekehrt (43, 1). Daraus folgt, daß niedermolekulares Heparin die Faktor-Xa-Aktivität stärker hemmt als die Thrombinaktivität. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist noch wenig über die spezielle Struktur bekannt, welche die biologisch aktive von der inaktiven Form unterscheidet. Es gibt aber Hinweise, daß die aktive Form des Heparins größere Glukuronsäurereste enthält. Es scheint, als ob durch eine geeignete Trennung dieser Reste in der Nähe der Iduronsäuregruppen ein grundsätzliches Strukturelement der gerinnungshemmenden Molekülaktivität darstellbar wird (86).

Über die Wirkung des Heparins in vivo entscheidet aber nicht nur die spezifische Aktivität, sondern auch die Verweildauer im Blut, die von den Eliminations- und Abbaumechanismen des Organismus abhängt (69).

Die Neutralisation des Heparins steht auch in besonderer Beziehung zu den Thrombozyten. Der heparinneutralisierende Faktor, der mit den Thrombozyten verbunden ist, wurde als Plättchenfaktor 4 (PF 4) bezeichnet. Bis heute ist die Strukturaufklärung unvollständig; man ist sich nur in dem Punkt einig, daß PF 4 ein kationisches Peptid mit 29 basischen Aminogruppenresten pro Molekül darstellt.

Der zentrale Trägeranteil scheint ein Proteoglykan mit einer Peptidstruktur und einem Molekulargewicht von 11.000 zu sein. An diesen sind vier Moleküle Chondroitinsulfat gebunden, die ein Molekulargewicht von 12.000 haben.

Der Plättchenfaktor 4 ist eine der Komponenten, die von den Thrombozyten bei der Aggregation freigesetzt werden. Diese Freisetzung von PF 4, z.B. nach Thrombozytzenzerstörung bei der disseminierten intravaskulären Koagulation, kann die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin verändern (28).

Bei Lungenembolien und schweren Phlebothrombosen ist im Vergleich zum gesunden Organismus ein gesteigerter Heparinbedarf von ca. 30 % zu beobachten, wobei neben anderen Faktoren eine erhöhte Freisetzung von PF 4 ursächlich für den erhöhten Heparinumsatz verantwortlich gemacht wird (35).

Nach i.v. Applikation ist die Abwanderungsrate aus dem Blut dosisabhängig. So beträgt die Halbwertszeit von Heparin bei 200 IE/kg KG 90 Minuten, bei 400 IE/kg KG etwa 150 Minuten (76, 17). Heparin wird durch ein als Heparinase bezeichnetes Leberenzym zu niedermolekularen Bruchstücken mit noch erhaltener gerinnungshemmender Wirkung abgebaut (41). Bereits wenige Minuten nach i.v. Injektion läßt sich im Harn das sogenannte Uroheparin nachweisen (4). Nach hohen Dosen werden im Harn bis zu 50 % nicht metabolisierten Heparins aufgefunden (22). Die Ausscheidung erfolgt über die Tubuli (64) und ist bei Niereninsuffizienz stark vermindert (80). Im Gegensatz zu den Cumarinen passiert Heparin nicht die Plazentaschranke und erscheint auch nicht in der Muttermilch (32). Weiter wird die Möglichkeit beschrieben, daß Heparin im Plasma über das retikuloendotheliale System eliminiert wird (18). Untersuchungen über den Metabolismus ergaben, daß Heparin nach intravenöser Injektion sehr rasch an die Gefäßendothelzellen absorbiert und von diesen gespeichert wird (41).

Zur Erklärung des antikoagulatorischen Heparineffekts im Plasma ist seine Wechselwirkung mit Antithrombin III, dem Heparin-Co-Faktor des Plasmas, wesentlich. Das Antithrombin III ist ein α_2 -Globulin des Humanserums mit einem Molekulargewicht von 65.000 Dalton und einem Polysaccharidanteil von 13 % (71, 83). Es wird von den Leberzellen und Endothelzellen gebildet (84,9) und ist im Plasma bei immunologischer Bestimmung mit einer Konzentration von $31,3 \pm 3,8$ mg/dl vorhanden, was einem normalen AT- III-Spiegel von 76 - 124 % entspricht (83).

1 mol Antithrombin III vermag 1 mol Thrombin irreversibel zu binden, während Heparin sich reversibel an Antithrombin III bindet (71) und die Tertiärstruktur dieses Enzyms so verändert, daß verschiedene Serinproteasen, z.B. die Faktoren VIIa, XIa und XIIIa, vor allem jedoch Thrombin und Faktor Xa schneller inaktiviert werden (71, 36).

Antithrombin III kann also auf jeder Aktivierungsstufe der "Gerinnungskaskade" regulierend eingreifen. Zusätzlich werden jedoch auch andere Serinproteasen wie Kalikrein und Plasmin durch Antithrombin III neutralisiert. In Abwesenheit von Heparin läuft diese Interaktion langsam progressiv ab (70).

Somit spielt das Antithrombin III in der Regulation des Gerinnungsvorgangs eine zentrale Rolle. Da endogenes Heparin im Blut auch bei intravaskulären Gerinnungsprozessen nicht oder nur in Spuren nachweisbar ist, verlagert sich bei der Suche nach einer physiologisch eventuell noch bedeutsamen Heparin-AT-III-Interaktion das Interesse zum Endothel und den angrenzenden Gewebeschichten (83), weil erstens mittels Immunfluoreszenz eine Anreicherung des AT III in der Kapillarwand verschiedener Gewebe nachgewiesen werden konnte und zweitens sich Heparin an den Endothelzellen anlagert und dort gespeichert wird (30).

Man kann daher annehmen, daß die physiologische Hauptfunktion der raschen AT-III-Aktivität am Gefäßendothel und im benachbarten Gewebe zu finden ist. Dies wäre eben dort, wo wir auch die Hauptfunktion der Blutgerinnung vermuten (83).

Die antikoagulatorische Wirkung des Heparins ist durch die Menge des vorhandenen AT III limitiert und in AT-III-Mangelplasmen deutlich herabgesetzt (15, 54, 73). Seine klinische Bedeutung läßt sich am besten an dem erhöhten Risiko bei lokalisierter und/oder disseminierter intravaskulärer Gerinnungskomplikation bei AT-III-Mangelsyndrom zeigen. Die Patienten mit AT-III-Mangel lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die eine umfaßt die Patienten mit hereditärem AT-III-Mangel, die andere Patienten mit erworbenem AT-III-Mangel.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Häufigkeit des hereditären AT-III-Mangels in der Gesamtbevölkerung 1 : 5000 ist, also ähnlich der Häufigkeit der Hämophilie. Die Gruppe mit erworbenem AT-III-Mangel umfaßt folgende Krankheitsbilder:

- disseminierte intravaskuläre Coagulation (DIC)
 —→ Verbrauch
- akute bzw. chronische Leberschäden
 —→ Synthesestörung
- nephrotisches Syndrom (über 5 g Eiweiß/Tag)
 —→ Verlust
- Östrogenbehandlung und Langzeit-Heparintherapie (hochdosierte)
- nach größeren Operationen, insbesondere im Thorax- und Abdominalbereich und nach orthopädischen Eingriffen

Man muß aufgrund eines erniedrigten AT-III-Spiegels auf unter 70 % der Norm davon ausgehen, daß der Patient nicht genügend gegen Thrombosen geschützt ist. Damit

wird dann die Verabreichung von Heparin weniger wirksam (45).

In den letzten 35 Jahren gewann die Heparintherapie immer mehr an Bedeutung. Die Indikation zu einer Antikoagulantientherapie mit Heparin leitet sich von dessen Eigenschaft als direkt wirkendem Antikoagulans mit sofortigem Wirkungseintritt ab. Entsprechend sind die allgemein akzeptierten Indikationen: Thromboseprophylaxe, tiefe Bein- und Beckenvenenthrombosen, akute Lungenembolien, Verbrauchskoagulopathien, das prä- und postoperative Stadium von akuten arteriellen Verschlüssen, der extrakorporale Kreislauf und Plasmapheresen (32). Auch in der Akutphase des Myokardinfarkts wird Heparin zur Vermeidung thromboembolischer Komplikationen eingesetzt (6).

Prinzipiell kann Heparin dem Patienten wie folgt verabreicht werden:

- intramuskuläre Injektion
- intravenöse Injektion
- subkutane Injektion
- sublingual
- rektal
- als Aerosol

Die sublinguale und rektale Verabreichung wurden als unzuverlässig verlassen (38). Die Diskussion über den Nutzen der Applikation als Aerosol ist im Fluß. Bei der Prophylaxe mit niedrig dosiertem Heparin wird im allgemeinen eine subkutane Applikation bevorzugt, und zwar in einer Dosierung von 3 x täglich 5000 IE Heparin.

Die i.m. Injektion sollte wegen möglicher Muskelblutungen vermieden werden. Ist ein sofortiger Wirkungseintritt (Lungenembolie, Verbrauchskoagulopathie) nötig, empfiehlt sich eine i.v. Behandlung. Bei Thrombophlebitiden, nach Herzinfarkt und besonders bei schlechten Ve-

nenverhältnissen kann eine s.c. Behandlung genauso erfolgreich sein. Eine allgemeine Dosisempfehlung ist nur schwer möglich, da die Heparinempfindlichkeit von Patient zu Patient schwankt und von dem Ausmaß des thromboembolischen Prozesses abhängt. Bei einer akuten Thromboembolie gelten 40.000 IE/24 h als erforderliche Durchschnittsdosis für den normalgewichtigen Erwachsenen. Die Heparinwirkung bei der tiefen Beinvenenthrombose ist insofern nur prophylaktisch, als eine weitere Ausdehnung des vorhandenen Thrombus verhindert werden soll. Die Rückbildung eines Gefäßverschlusses ist weniger eine Folge direkter Heparineinwirkung als die eines endogenen Mechanismus wie Fibrinolyse, Organisation und Rekanalisation (32). Im Stadium der floriden Thrombose oder Lungenembolie verlängert eine therapeutische Heparindosis die Gerinnungszeit oft nur gering, während dieselbe Dosis am 3. oder 4. Behandlungstag durch eine Art Heparin-Überempfindlichkeit zu stark verlängerter Gerinnungszeit und zu Blutungskomplikationen führen kann. Sorgfältige und häufige Gerinnungszeitkontrollen sind deshalb in diesem kritischen Stadium erforderlich (2). Die Dauer der Heparintherapie hängt vom Ausmaß und der Schwere des Krankheitsbildes ab. Nach durchschnittlich 7 Tagen wird in der Regel auf orale Antikoagulantien vom Cumarintyp für die Dauer von 6 Monaten umgesetzt. Eine Indikation zur Heparintherapie ist auch die DIC (Disseminierte intravasale Gerinnung = Verbrauchskoagulopathie). Die Verbrauchskoagulopathie, oft mit sekundärer Fibrinolyse, ist eine erworbene Gerinnungsstörung, die durch eine intravasale Aktivierung des Gerinnungs- und nachfolgend Fibrinolysesystems hervorgerufen werden kann. Eine erfolgreiche Behandlung dieses Zustands hängt von der suffizienten Behandlung der Grunderkrankung ab (Schock, Sepsis). Wenn eine Verbrauchskoagulopathie allerdings fortgeschritten ist, nutzt die alleinige Gabe von Heparin meist wenig, da der Zustand neben einem Ver-

brauch von Gerinnungsfaktoren mit einem Verbrauch von AT III einhergeht. Heparin kann jedoch nur bei adäquatem AT-III-Spiegel voll wirksam sein (2, 53, 67). Daher ist es sinnvoll, bei Patienten, bei denen aufgrund ihrer Erkrankung eine DIC häufig beobachtet wird, prophylaktisch Heparin zu applizieren. Besteht bereits das Vollbild einer Verbrauchskoagulopathie mit Thrombozytopenie, Verminderung der Faktoren V, VIII, XIII, Hypofibrinogenämie, müssen zusätzlich zum Heparin Frischplasma, Antithrombin III und die Gerinnungsfaktoren substituiert werden. Zur Behandlung einer Verbrauchskoagulopathie werden allgemein niedrigere Heparindosen empfohlen, welche etwa die Hälfte der antithrombotischen Dosis betragen (53).

Heparin ist das Mittel der Wahl bei thromboembolischen Komplikationen in der Schwangerschaft, da es im Gegensatz zu den oralen Antikoagulantien für den Fötus keine Gefahr darstellt (33, 34). Erwähnt sei noch die Heparintherapie bei Patienten mit Verbrennungen (72). Die Indikation für Heparin bei der arteriellen Verschlusskrankheit ist umstritten (67).

Bei der i.v. Therapie wird Heparin in der gewünschten Konzentration als Dauertropfinfusion in 5 %iger Glukose oder 0,9 %iger NaCl-Lösung gegeben. Günstiger ist eine Infusionspumpe, da die Tropfgeschwindigkeit nicht immer genau überwacht werden kann. Eine andere Möglichkeit ist die intermittierende Therapie, bei der 5.000 - 10.000 IE alle 4 - 6 Stunden durch einen liegenden Venenkatheter i.v. gegeben werden. Zur s.c. Anwendung stehen enger konzentrierte Heparine zur Verfügung. Diese Heparine kommen in Fertigampullen in einer Konzentration von 20.000 IE bzw. 25.000 IE/ml auf den Markt (32).

Calciumheparinat und Natriumheparinat sind klinisch gleichwertig wirksam. Es besteht kein Grund zu der Annahme, daß die eine Heparinatform gegenüber der anderen irgendwelche klinisch relevanten Vorteile bietet. Auch sind die Nebenwirkungen der beiden Heparinformen ähnlich (74, 51).

Das Ziel einer Heparinbehandlung ist, die angestrebte klinische Wirksamkeit zu erreichen, andererseits aber Nebenwirkungen möglichst zu vermeiden. Die entscheidende Komplikation bei der Therapie mit Heparin ist die Blutung. Es wird daher die Dosierung in der Praxis letzten Endes durch das Blutungsrisiko bestimmt. Hier muß man zwischen leichten und schwerwiegenden, oft lebensbedrohlichen Blutungskomplikationen unterscheiden (Tab. 1).

Tab. 1 Blutungskomplikationen unter Heparintherapie
(nach Niessner, Lechner, 1980)

"Leichte" Blutungskomplikationen

- Epistaxis, Zahnfleischblutungen, Haemoptysen
- Haematome (Stichstellen)
- Haematurie
- Subconjunktivalblutungen

Gefährliche Blutungskomplikationen

- Blutungen im Operationsgebiet
- Zerebrale, subdurale, epidurale, intraspinale Blutungen
- Magen-Darmblutungen, Darmwandblutungen (Ileus)
- Nebennierenblutungen
- Haemobilie
- Retinablutungen

brauch von Gerinnungsfaktoren mit einem Verbrauch von AT III einhergeht. Heparin kann jedoch nur bei adäquater AT-III-Spiegel voll wirksam sein (2, 53, 67). Daher ist es sinnvoll, bei Patienten, bei denen aufgrund ihrer Erkrankung eine DIC häufig beobachtet wird, prophylaktisch Heparin zu applizieren. Besteht bereits das Vollbild einer Verbrauchskoagulopathie mit Thrombozytopenie, Verminderung der Faktoren V, VIII, XIII, Hypofibrinogenämie, müssen zusätzlich zum Heparin Frischplasma, Antithrombin III und die Gerinnungsfaktoren substituiert werden. Zur Behandlung einer Verbrauchskoagulopathie werden allgemein niedrigere Heparindosen empfohlen, welche etwa die Hälfte der antithrombotischen Dosis betragen (53).

Heparin ist das Mittel der Wahl bei thromboembolischen Komplikationen in der Schwangerschaft, da es im Gegensatz zu den oralen Antikoagulantien für den Fötus keine Gefahr darstellt (33, 34). Erwähnt sei noch die Heparintherapie bei Patienten mit Verbrennungen (72). Die Indikation für Heparin bei der arteriellen Verschlusskrankheit ist umstritten (67).

Bei der i.v. Therapie wird Heparin in der gewünschten Konzentration als Dauertropfinfusion in 5 %iger Glukose oder 0,9 %iger NaCl-Lösung gegeben. Günstiger ist eine Infusionspumpe, da die Tropfgeschwindigkeit nicht immer genau überwacht werden kann. Eine andere Möglichkeit ist die intermittierende Therapie, bei der 5.000 - 10.000 IE alle 4 - 6 Stunden durch einen liegenden Venenkatheter i.v. gegeben werden. Zur s.c. Anwendung stehen enger konzentrierte Heparine zur Verfügung. Diese Heparine kommen in Fertigampullen in einer Konzentration von 20.000 IE bzw. 25.000 IE/ml auf den Markt (32).

Calciumheparinat und Natriumheparinat sind klinisch gleichwertig wirksam. Es besteht kein Grund zu der Annahme, daß die eine Heparinatform gegenüber der anderen irgendwelche klinisch relevanten Vorteile bietet. Auch sind die Nebenwirkungen der beiden Heparinformen ähnlich (74, 51).

Das Ziel einer Heparinbehandlung ist, die angestrebte klinische Wirksamkeit zu erreichen, andererseits aber Nebenwirkungen möglichst zu vermeiden. Die entscheidende Komplikation bei der Therapie mit Heparin ist die Blutung. Es wird daher die Dosierung in der Praxis letzten Endes durch das Blutungsrisiko bestimmt. Hier muß man zwischen leichten und schwerwiegenden, oft lebensbedrohlichen Blutungskomplikationen unterscheiden (Tab. 1).

Tab. 1 Blutungskomplikationen unter Heparintherapie
(nach Niessner, Lechner, 1980)

"Leichte" Blutungskomplikationen

- Epistaxis, Zahnfleischblutungen, Haemoptýsen
- Haematome (Stichstellen)
- Haematurie
- Subconjunktivalblutungen

Gefährliche Blutungskomplikationen

- Blutungen im Operationsgebiet
- Zerebrale, subdurale, epidurale, intraspinale Blutungen
- Magen-Darmblutungen, Darmwandblutungen (Ileus)
- Nebennierenblutungen
- Haemobilie
- Retinablutungen

Die intrakraniellen, die gastrointestinalen und retroperitonealen Blutungen, die den weitaus größten Prozentsatz an schweren und zum Teil tödlich verlaufenden Blutungskomplikationen ausmachen, seien besonders erwähnt (59). Heparininduzierte Blutungen zählen noch immer zu den häufigsten medikamentös bedingten Todesursachen bei stationär aufgenommenen Patienten (65).

Die Gefahr einer Blutung nimmt zu, wenn Kontraindikationen (Tab. 2) (z.B. gleichzeitige Gabe von Aggregationshemmern) nicht beachtet werden (59).

Tab. 2 Absolute Kontraindikationen für Heparintherapie (modifiziert nach Niessner, Lechner (1980))

Zusätzliche Haemostasestörung

Perorale Antikoagulantien

Thrombozytopenie (heparininduziert)

Angeborene haemorrhagische Diathese

Manifeste Blutungsquellen im Magen-Darm-Trakt

Manifeste Blutungsquellen im Respirationstrakt

Manifeste Blutungsquellen im Urogenitaltrakt

Endocarditis lenta

Dissoziierendes Aortenaneurysma

10 - 15 Tage postoperativ (ZNS, Prostata)

Frischer apoplektischer Insult

Akute Pankreatitis

Patienten mit Leberkrankheiten (81) oder verminderter Nierenfunktion (80) können Heparin weniger schnell abbauen und sollten daher kleinere Dosen erhalten. Eine Thrombozytopenie wird als Komplikation mit zunehmender Häufigkeit beobachtet. Bei einem Teil der Patienten führte die heparininduzierte Thrombopenie zur arteriellen Thrombose (68). Thrombozytopenie beruht wahrscheinlich auf einer heparininduzierten Antikörperbildung

(20, 25). Daher sollte bei jedem Patienten unter Heparintherapie regelmäßig die Thrombozytenzahl bestimmt werden. Eine längerfristige Heparintherapie über ein Jahr mit hohen Dosen kann auch zu einer Osteoporose führen (27). Bei stark verlängerten Gerinnungszeiten mit kleineren Blutungen reicht es in der Regel aus, Heparin vorübergehend abzusetzen. Schwere Blutungen erfordern die Gabe eines Heparinantagonisten, um das in Richtung Ungerinnbarkeit verschobene Gleichgewicht des Gerinnungssystems wiederherzustellen. Das Mittel der Wahl ist Protaminchlorid. Zur Dosierung von Protamin gilt die Näherung, daß 1,3 mg Protaminchlorid 100 USP E Heparin inaktivieren. Zur Erleichterung der Dosierung ist Protaminchlorid in Ampullen so abgepackt, daß 1 ml Lösung 1000 bzw. 5000 USP E Heparin inaktiviert (Protaminchlorid 1000^R bzw. Protaminchlorid 5000^R). Bei der Dosierung ist die Halbwertszeit von Heparin zu berücksichtigen (19). Protaminsulfat ist weniger günstig, da sich dieses Salz in der Ampulle zersetzt (47).

Heparin greift in die verschiedenen Stufen der Gerinnungskaskade ein. Bis vor einem Jahrzehnt wurden Tests empfohlen, wie z.B. Vollgerinnungszeit, die beschleunigte Vollblutgerinnungszeit sowie thrombozytenreiche Plasmarekalzifizierung, um die Heparintherapie zu überwachen (86). Die genannten Labortests werden durch Thrombozyten mit beeinflußt, da einerseits die Plättchen ein kationisches Protein mit Antiheparinaktivität (PF 4) enthalten (28), andererseits die Plättchenzahl von Patient zu Patient unterschiedlich ist. Daher wurden diese Tests zugunsten besser reproduzierbarer Methoden verlassen. Es hat sich gezeigt, daß die Ergebnisse bei Tests mit plättchenarmem Plasma exakter sind (86). Idealerweise sollte die Laborüberwachung einer Heparintherapie genau, empfindlich und reproduzierbar sein.

Die heute allgemeingebräuchlichsten Gerinnungstests sind die "aktivierte partielle Thromboplastinzeit" (aPTT) und die "Thrombinzeit" (TZ) (31). Beide Tests sind rasch durchführbar und gut reproduzierbar. Unglücklicherweise unterscheiden sich die handelsüblichen Thromboplastine, die zur Bestimmung der aPTT verwendet werden, stark in ihrer Heparinempfindlichkeit (77, 75). Die Thrombinzeit wird nicht wie die aktivierte partielle Thromboplastinzeit durch Plasmafaktorenmangel verändert. Der Hauptnachteil dieses Tests besteht darin, daß er nur den Antithrombineffekt und deshalb nur das Vorhandensein von Heparin und nicht seine Wirksamkeit als Gerinnungshemmer mißt (86).

Protaminsulfat oder Polybrentitration wurden ebenfalls als Möglichkeit der Heparintherapieüberwachung beschrieben (10). Sie sind allerdings schwierig zu standardisieren und zeitaufwendig (62, 26).

1976 gelang es erstmals, photometrisch in einem chromogenen Substrat die Konzentration des Heparins im Blut zu bestimmen (82). Die Anwendung eines synthetischen Substrats S-2222 ist eine Variation der photometrischen Testmethode (79). Die Grundlage in diesem Testsystem ist die Fähigkeit, von heparinaktiviertem Antithrombin III den Faktor X zu hemmen (89, 56).

2. FRAGESTELLUNG

Trotz der großen therapeutischen Breite ist die Heparinbehandlung nicht ohne Risiko. Zum einen können bei der Überdosierung gravierende Blutungskomplikationen auftreten, zum anderen können sich bei Unterdosierung erhebliche Folgen für den Verlauf der zu behandelnden Grunderkrankungen ergeben. Als Konsequenz aus diesen Überlegungen ist die Notwendigkeit einer Laborüberwachung der Heparintherapie unerlässlich. Hier haben sich vor allem die Thrombinzeit und die partielle Thromboplastinzeit durchgesetzt und für den klinischen Alltag im allgemeinen auch bewährt (31).

Probleme ergeben sich jedoch, wenn trotz üblicher Dosierung die Werte dieser in-vitro-Tests unter dem sogenannten therapeutischen Bereich liegen oder wenn der Schlüsselpunkt der Gerinnung im Test nicht mehr bestimmbar ist. Neben den genannten Labormethoden zur Überwachung einer Heparintherapie ist seit wenigen Jahren die direkte Messung von Heparin im Plasma mittels chromogener oder fluorogener synthetischer Substrate möglich (82, 3).

Es soll mit dieser Arbeit untersucht werden, welche Beziehung zwischen Thrombinzeit, der partiellen Thromboplastinzeit, dem Fibrinogen und dem Antithrombin III einerseits und der Heparinkonzentration andererseits besteht, bzw. unter welchen Heparinkonzentrationen die aktivierte partielle Thromboplastinzeit und die Thrombinzeit nicht mehr bestimmbar sind. Ferner soll der Frage nachgegangen werden, welcher Stellenwert der direkten Heparinmessung in der Klinik zukommt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Normalplasma

Von 10 gesunden männlichen Versuchspersonen wurden je 9 ml Blut aus einer Kubitalvene entnommen. In den dazu verwendeten Plastikspritzen war 1 ml 0,15-molare Trisnatriumcitratlösung vorgelegt. Es erfolgte eine getrennte Zentrifugation über 10 Minuten bei Raumtemperatur und 4500 g (Zentrifuge: Minifuge 2, Heraeus-Christ GmbH, Osterode). Das überstehende zellfreie Plasma wurde abpipettiert, gemischt und in 2 ml-Portionen bei -70 °C eingefroren.

3.2 Blutentnahme beim Patienten

Wir verwendeten 5 ml-Kunststoffmonovetten (Sarstedt, Nümbrecht), in denen bereits 0,5 ml 3,8 %iger Natriumcitratlösung vorgelegt waren. Die Blutentnahme erfolgte entweder durch Punktion einer Vene am Arm oder durch einen Vena-jugularis-Katheter bei Patienten mit extrakorporalem Kreislauf. Auch hier Zentrifugation über 10 Minuten bei 4500 g und Raumtemperatur. Das überstehende zellfreie Plasma wurde abpipettiert und bei -30 °C eingefroren.

Der Zeitpunkt der Blutentnahme ist wichtig, da die in-vivo-Halbwertszeit des Heparins nur etwa 1 1/2 Stunden beträgt (17). Eine Einzeldosis Heparin hat eine sofortige antikoagulierende Wirkung, die aber im Lauf der Zeit sehr schnell abnimmt. Diese Schwankungen werden besonders deutlich, wenn Heparin als Einzeldosierung in regelmäßigen Abständen verabreicht wird.

Der Plättchenfaktor 4, ein heparinneutralisierender Faktor, kann aus den Plättchen freigesetzt werden. Die Freisetzung von Plättchenfaktor 4 kann durch Plättchenaggregation oder Plättchenzerstörung ausgelöst werden (28). Um dies in vitro zu verhindern, sollte das Blut mit einem Minimum an Gewebsverletzung gewonnen werden. Es empfiehlt sich, das Blut mit einer Kunststoffspritze zu entnehmen. Vakuumröhrchen sollten nur mit äußerster Vorsicht zur Entnahme von heparinisiertem Blut verwendet werden. Das dem Blut durch die Vakuumaspiration zugefügte Trauma kann die Testresultate verfälschen.

Es ist darauf zu achten, daß sowohl das Patientenblut als auch das für den Plasmapool gewonnene Blut ausreichend zentrifugiert werden, um das Plasma möglichst plättchenfrei zu bekommen.

3.3 Thrombinzeit (TZ) (48)

Die Thrombinzeit wird vor allem zur Kontrolle der gerinnungshemmenden Wirkung bei der Therapie mit Heparin und zur Kontrolle der fibrinolytischen Wirkung bei der Behandlung mit Streptokinase eingesetzt.

Prinzip

Die Gerinnungszeit von unverdünntem Citratplasma wird nach Zusatz einer kleinen Menge von Thrombin bestimmt.

Reagenzien

- a) plättchenarmes Patientenplasma
- b) Thrombinreagenz (Merz und Dade, München)

Stammlösung (80 NIH-Einheiten):

Das gefriergetrocknete, aus Rinderplasma gewonnene Material eines Fläschchens wird mit genau 1,0 ml bidestilliertem Wasser gelöst und gemischt. Diese Stammlösung wird unmittelbar vor Versuchsbeginn 1 : 31 verdünnt, um eine Arbeitslösung von 2,5 NIH-Einheiten zu erhalten.

Durchführung des Tests

0,2 ml plättchenarmes Plasma werden in ein Glasröhrchen pipettiert und 2 Minuten auf 37 °C erwärmt.

0,2 ml Thrombinlösung (2,5 NIH) werden zugegeben und der Koagulometer (nach Schnitger und Gross, Heinrich Amelung KG, Typ A410 A 4 MD) wird gestartet. Die Zeit bis zum Eintritt der Gerinnung wird automatisch registriert.

3.4 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) (66)

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit dient als Screening-Test zum Nachweis von Störungen im endogenen Gerinnungssystem, wobei die Faktoren I, II, V, VIII, IX, X, XI und XII global erfaßt werden. Zusätzlich wird der Test auch bei der Kontrolle einer Heparintherapie angewandt.

Prinzip

Die Rekalzifizierung eines plättchenarmen Citratplasmas wird unter Zugabe einer optimalen Menge von Lipid bei 37 °C bestimmt. Unter diesen Bedingungen hängt die Gerinnungszeit nur von der Aktivität der Faktoren des endogenen Systems und der gemeinsamen Endstrecke ab.

Reagenzien

- a) plättchenarmes Citratplasma
- b) aPTT-Reagenz (Platelin^R Plus Activator Automated, Gödecke, Berlin)
- c) 0,025-molares Calciumchlorid

Durchführung des Tests

Die in unserem Laboratorium eingeführte Methode wird wie folgt durchgeführt:

3,0 ml Aqua bidest. in ein Fläschchen aPTT-Reagenz pipettieren und leicht schütteln.

0,1 ml plättchenarmes Plasma des Patienten wird mit einer Pipette in ein vorgewärmtes Plastikröhrchen pipettiert und 2 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Anschließend werden 0,1 ml Platelin^R Plus Activator, der auch 2 Minuten bei 37 °C vorgewärmt wurde, zugegeben, kurz geschüttelt und die Mischung 120 Sekunden bei 37 °C gewärmt.

Danach werden 0,1 ml 0,025-molares Calciumchlorid (CaCl_2) (Fa. Behring, Marburg) zugegeben und die Gerinnungszeit mit Hilfe des Schnitger-Gross-Koagulometers bestimmt.

3.5 Fibrinogenbestimmung (Faktor I) nach Clauss (12)

Indikationen zur Bestimmung des Fibrinogens sind der Verdacht auf Hypofibrinogenämie bei Verbrauchskoagulopathie, Hyperfibrinolyse, Dysfibrinogenämie oder eine Hypo- bzw. Afibrinogenämie anderer Ursache, z. B. bei Streptokinase- oder Urokinasetherapie oder einer fibrinogensenkenden Behandlungen mit Schlangengiftpräparaten.

Prinzip

Mit Puffer verdünntes Citratplasma wird mit einem Überschuß von Thrombin zum Gerinnen gebracht. Die Gerinnungszeit in diesem System hängt weitgehend von der Konzentration des Fibrinogens im Plasma ab.

Reagenzien

- a) plättchenarmes Citratplasma des Patienten
- b) Owen's Veronalpulver (pH 7,35)
- c) Thrombinlösung (Thrombin bovin^R, Merz und Dade, München)

Durchführung des Tests

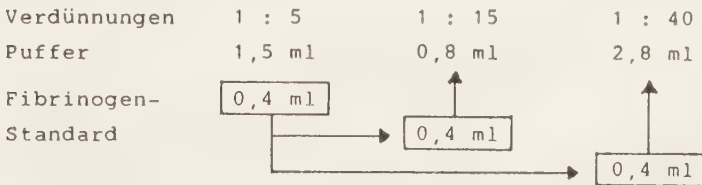
Thrombinlösung mit 1 ml destilliertem Wasser auflösen.
0,2 ml 1 : 10 mit Veronalpuffer verdünntes Plasma werden 3 Minuten bei 37 °C angewärmt.

0,1 ml Thrombinlösung (Raumtemperatur) werden zugegeben.
Die Gerinnungszeit wird bestimmt.

Berechnung des Ergebnisses

Die Berechnung des Ergebnisses erfolgt anhand einer Eichkurve, die mit Hilfe eines Plasmas von bekanntem Fibrinogengehalt erstellt wird.

Mit Owen's Veronalpuffer (Merz und Dade, München) den Fibrinogen-Standard 1 : 5, 1 : 15, 1 : 40 verdünnen.



Mit diesen 3 Verdünnungen werden Doppelbestimmungen wie folgt angesetzt:

1. 0,2 ml Fibrinogen-Standardlösung 3 Minuten bei 37 °C inkubieren.
2. 0,1 ml Thrombinlösung zugeben und damit die Reaktion starten.
3. Gerinnungszeit bestimmen.
4. Die ermittelten Zeiten (Mittelwerte) werden auf doppellogarithmischem Papier eingetragen, die Zeit in Sekunden auf der Ordinate und die Fibrinogenkonzentration des Standards in mg/dl auf der Abszisse. Die Verbindung der drei Punkte ergibt annähernd eine Gerade.

3.6 Heparin- und Antithrombin III-Bestimmung¹

Wir verwendeten zur Bestimmung der Heparinkonzentration die von Mitchell et. al. entwickelte photometrische Testmethode unter Verwendung eines fluorogenen Substrats (58).

Fluoreszenz

Fluoreszenz ist die Strahlenausendung eines Stoffes, die durch Absorption einer Strahlung aus einer anderen Quelle verursacht wird und nur während dieser Absorption erfolgt.

3.6.1 Anwendung und Funktion des Gerätes

Das Dade Protopath Fluorometer (Merz und Dade, München) dient zum Nachweis proteolytischer Enzyme mit Hilfe von synthetischen Substraten.

a) Funktionsbeschreibung

Das Protopath-System besteht aus einem Filterfluorometer mit fester Wellenlänge und Reagenziensätzen. Mit diesem System wird die Technologie der synthetischen Substrate angewandt zur Messung von wichtigen Komponenten der Blutgerinnung. Diese Technik ist unabhängig von den herkömmlichen Gerinnungsmeßmethoden. Sie beruht auf enzymatisch-kinetischen Methoden mit fluorometrischer Messung und Digitalanzeige.

b) Beschreibung des Gerätes

Das Protopath Fluorometer ist ein Tischgerät in einem kompakten Gehäuse aus Metall mit den Abmessungen 20,3 x 47,5 x 35,6 cm. Alle Bedienelemente (mit Ausnahme des Drehknopfes Meßfenster und des Hauptknopfes) sind Sensortasten und befinden sich an der Gerätevorderseite. Verbindungselemente (Drucker und

¹ Entnommen aus dem "Handbuch für das Dade Protopath Fluorometer" der Firma Merz und Dade, München.

Streifenschreiber) sind auf der Rückwand angebracht. Die Proben- und Inkubationsvertiefung sind im optischen Block enthalten und durch eine Schiebeplatte auf der Oberseite des Gerätes leicht zugänglich.

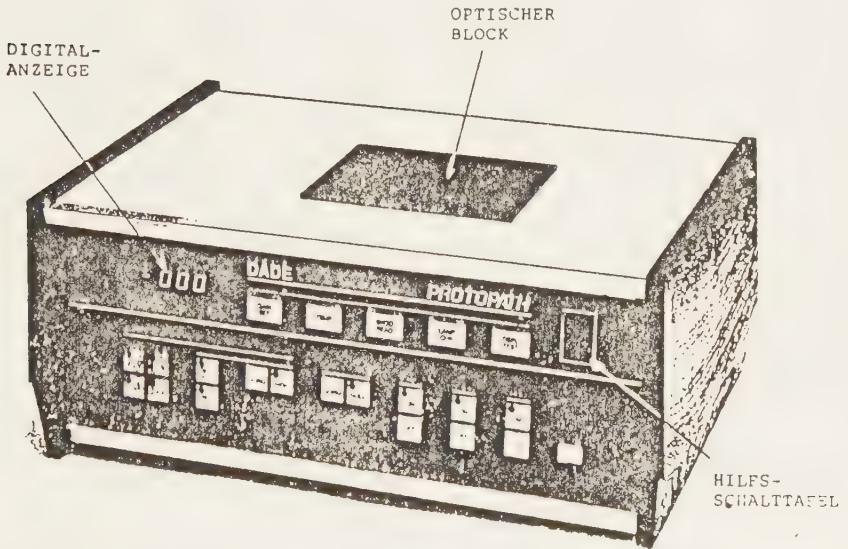


Abb. 4 Entnommen aus dem Handbuch für das Protomath Fluorometer der Firma Merz und Dade, München

c) Testprobe

Eine Testprobe in einer temperierten Probenvertiefung wird mit Licht aus einer Quecksilberniederdrucklampe bestrahlt. Ein optischer Filter zwischen Lichtquelle und Probe bestimmt die Wellenlänge des einfallenden Lichts. Ein Fotomultiplier und Filter im rechten Winkel zum einfallenden Licht registrieren die von der Probe ausgestrahlte Fluoreszenz. Der registrierte Lichtstrahl wird in ein elektronisches Signal umgewandelt und digital angezeigt (Abb. 5).

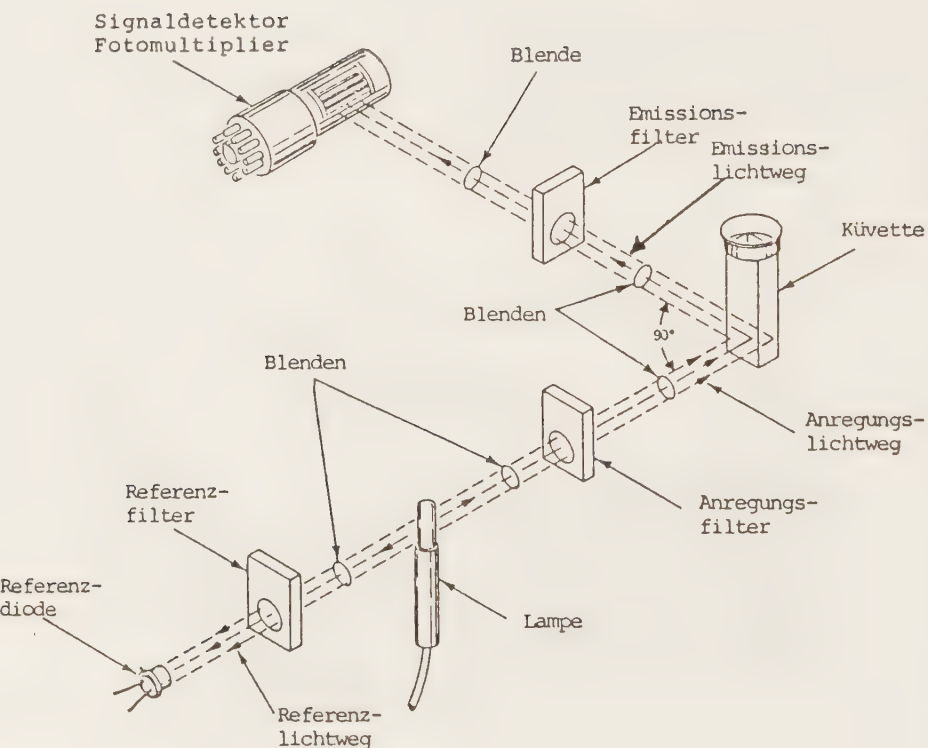


Abb. 5 Schematischer Lichtweg - Protopath Fluorometer (entnommen aus dem Handbuch für das Protopath Fluorometer, Merz und Dade, München)

3.6.2 Eichung und Vorbereitung des Gerätes zur Heparin-/AT-III-Bestimmung

1. Das Gerät wird frühzeitig eingeschaltet (ca. 45 Minuten vor den Messungen), damit es bei Gebrauch einer Temperatur im Thermoblock von $37,5^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,2$) entspricht.
2. Mehrere Kunststoffröhrchen werden zum Vorwärmen in ein Wasserbad von 37°C gestellt.

3. Unterdessen werden die Reagenzien gelöst und die Verdünnungen für die Heparin-Bezugskurven oder die Patientenplasmen hergerichtet.
4. Danach wird das Programm Heparin- oder Antithrombin-III-Bestimmung (Selektionstaste A bzw. B) gewählt und auch die Taste Hintergrundnorm gedrückt, um das Instrument auf Hintergrund-Null einzustellen.
5. Bei geschlossenem Deckel (Schiebeplatte) und ohne Küvette im Strahlengang werden die folgenden Digitalablesungen durch Druck auf die entsprechenden Tasten vorgenommen:
 - a) Temperaturkontrolle (Prüfung, ob der Inkubationsblock die vorgeschriebene Temperatur von 37,5 °C erreicht hat)
 - b) Lampenkontrolle
 - c) Anzeigenkontrolle
6. Die Taste Messzeit Ein wird betätigt (es ist eine Meßzeit von 186 Sekunden eingestellt).
7. Das feste Referenzmaterial in Form eines Plastikblocks wird in den Strahlengang eingesetzt und die Taste Hintergrundmessung solange gedrückt, bis sich die Digitalanzeige stabilisiert hat. Der abgelesene Wert wird notiert und das Referenzmaterial herausgenommen.

3.6.3 Reagenzien zur Heparin-/AT-III-Bestimmung¹

a) Citratplasmareagenz

Es handelt sich um einen lyophilisierten humanen Citratplasmapool in einer Pufferverdünnung mit Konservierungsmitteln. Er wird mit 5,0 ml destilliertem Wasser aufgelöst, das Fläschchen wieder verschlossen und bis zur vollständigen Lösung vorsichtig geschwenkt.

¹ Bezugsquelle aller Reagenzien ist die Firma Merz und Dade, München.

b) Thrombinreagenz (human)

Ein lyophilisiertes Präparat von gereinigtem humanem Thrombin in Pufferlösung mit Stabilisator. Das gelöste Reagenz enthält ca. 1 NIH U/ml Thrombin. Es wird mit 1,0 ml destilliertem Wasser gelöst, das Fläschchen wieder verschlossen und bis zur vollständigen Lösung vorsichtig geschwenkt.

c) Heparin-Control

Der lyophilisierte humane Citratplasmapool, dem Na-Heparinat zugesetzt ist, wird mit 0,5 ml destilliertem Wasser gelöst, das Fläschchen wieder verschlossen und vorsichtig bis zur vollständigen Lösung geschwenkt. Die Analysenwerte in Prozent Restthrombin können einem Beipackzettel entnommen werden. Der angegebene Bereich gilt als Richtwert für die Beurteilung der eigenen Werte und des Vertrauensbereichs.

Anmerkung

Analysenwerte außerhalb des Vertrauensbereichs sind ein Hinweis auf den Verfall der Reagenzien.

d) Thrombinsubstrat-Küvetten

Dies ist ein lyophilisiertes Präparat von 0,3 mol D-Phenylalanin-Prolin-Arginin-AIE (D-Phe-Pro-Arg-AIE) in Puffer mit Stabilisator in Einmalküvetten, verpackt in Alu-Beuteln. Sie werden jeweils mit 2,0 ml destilliertem Wasser gelöst. Das gelöste Reagenz enthält 0,15 mol/ml Substrat. Nach der vollständigen Lösung werden die Küvetten in den Thermoblock des Gerätes gestellt und 10 Minuten bei 37,5 °C aufgewärmt.

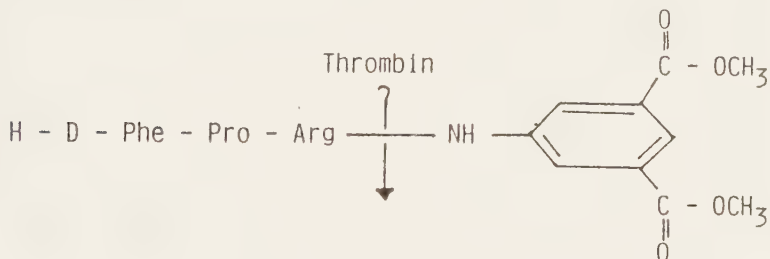
e) Heparinreagenz

Eine gepufferte Lösung von 1 USP U/ml Heparin mit Stabilisator. Die Lösung wird bei 2 - 8 °C aufbewahrt.

3.6.4 Messung der Heparin-Aktivität im Plasma mit synthetischem Substrat

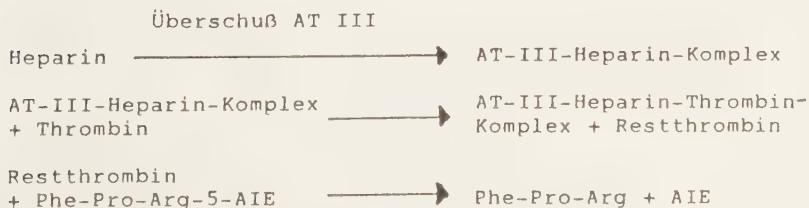
Prinzip

Das synthetische Substrat, das in dieser fluorometrischen Methode verwendet wird, ist ein D-Phenylalanin-Prolin-Arginin-5-Amidoisophtalinsäure-Dimethylester.



Die Thrombinaktivität wird kinetisch bestimmt, indem die Freisetzung des fluoreszierenden Moleküls 5-Aminoisophtalinsäuredimethylester (AIE) aus dem Substrat mit dem Protopath Fluorometer gemessen wird. Heparin, das in Gegenwart des Heparin-Co-Faktors Antithrombin III als Thrombininhibitor wirkt, wird wie folgt indirekt gemessen:

Ein verdünnter Normalplasmapool wird zu einer heparinierten Plasmaprobe gegeben, um eventuelle Schwankungen des Antithrombin-III-Spiegels im Testplasma zu eliminieren. Danach wird Thrombin zugesetzt und das Gemisch inkubiert; die verbleibende Thrombinaktivität wird dann gemessen. Der chemische Vorgang der Protopath-Heparinbestimmung mit synthetischem Substrat läßt sich wie folgt darstellen:



Die Heparinwerte im Testplasma werden direkt von einer Standard-Heparinkurve abgelesen.

3.6.5 Material zur Durchführung des Tests

Reagenziensatz

Citratplasmareagenz

Thrombinreagenz (human)

Thrombin-Substrat-Küvetten

Heparin-Control

Zusätzlich notwendiges Material

1. Das in der Therapie verwendete Heparin zur Erstellung einer Heparin-Bezugskurve
2. Normalplasmapool für die Erstellung einer Heparin-Bezugskurve
3. Kunststoffröhrchen (12 x 75 mm) für die Vorinkubation der Plasmaproben mit Heparin und Thrombin
4. Stoppuhr
5. 5,0 ml, 2,0 ml, 1,0 ml, 0,5 ml, 0,2 ml, 0,05 ml-Glas- und Eppendorf-Pipetten und eine 5 µl-Präzisionspipette (5 SMI-Pipette)
6. Bidestilliertes Wasser
7. Wasserbad mit 37 °C
8. Eisbad, um die Reagenzien bei 2 - 8 °C aufzubewahren
9. Zellstofftücher

Die Reagenzien werden im Kühlschrank aufbewahrt; nach dem Auflösen werden sie in ein Eisbad gestellt.

Anmerkung

Um genaue und reproduzierbare Werte zu erzielen, sind sehr genaue Präzisionspipetten sowie eine sorgfältige Technik unerlässlich.

3.6.6 Ausführung

Instrumentenvorbereitung

1. Das Gerät wird frühzeitig eingeschaltet (ca. 45 Minuten), damit es bei Gebrauch eine Temperatur von 37°C ($\pm 0,2$) aufweist.
2. Mehrere Kunststoffröhrchen (12 x 75 mm) werden zum Vorwärmen in den Thermoblock oder ins Wasserbad gestellt. Unterdessen werden die Heparin-Bezugskurve und die Reagenzien vorbereitet.

3.6.7 Erstellung der Heparin-Bezugskurven

Verwendete Heparine

- a) Calciparin^R, Choay, Erkrath (Abb. 6, Tab. 3)
- b) Thrombophob^R, Nordmark-Werke, Hamburg (Abb. 7, Tab. 4)
- c) Heparin Riker, Kettelhack Riker, Borken (Abb. 8, Tab. 5)
- d) Heparin-Natrium, Braun Melsungen, Melsungen (Abb. 9, Tab. 6)
- e) Liquemin^R, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen (Abb. 10, Tab. 7)

Von den obengenannten Heparinpräparaten werden Verdünnungen hergestellt, um Stammlösungen zu erhalten, die jeweils 80 U/ml enthalten. Dazu wird das injizierbare Heparin mit isotoner (0,85 %iger) NaCl-Lösung verdünnt, um dann schließlich die Heparin-Bezugskurven zu erhalten.

Die Heparin-Stammlösung (80 U/ml) wurde wie folgt weiterverdünnt:

1. 0,1 ml 80 U/ml Stammlösung
+ 0,9 ml Plasma = 8 U/ml
2. 0,1 ml des 8 U/ml Standards
+ 0,9 ml Plasma = 0,8 U/ml

3. 0,5 ml des 0,8 U/ml Standards
+ 0,5 ml Plasma = 0,4 U/ml
4. 0,5 ml des 0,4 U/ml Standards
+ 0,5 ml Plasma = 0,2 U/ml
5. 0,5 ml des 0,2 U/ml Standards
+ 0,5 ml Plasma = 0,1 U/ml
6. 0,5 ml des 0,1 U/ml Standards
+ 0,5 ml Plasma = 0,05 U/ml
7. 0,25 ml des 0,1 U/ml Standards
+ 0,25 ml des 0,05 U/ml Standards = 0,075 U/ml
8. 0,5 ml Plasma = Nullstandard (Heparin-Leerwert)

Der 8 U/ml Standard wird verworfen, und die anderen heparinisierten Plasmastandards sowie der Nullstandard werden bis zum Gebrauch bei 2 - 8 °C aufbewahrt.

Es wurden von 5 Heparinen verschiedener Hersteller Standardkurven angelegt. Dabei wurden die eben angegebenen Verdünnungen angefertigt. Außerdem wurde ein Plasmapool ohne Zugabe von Heparin untersucht, um einen Nullwert zu erhalten.

Bei jeder dieser Verdünnungsstufen wurden 5 Werte ermittelt, ausgedrückt in % Restthrombin (Tab. 3 - 7). Es wurden zwei verschiedene Chargen desselben Heparins als Vergleich gemessen und zu jedem der Heparine zwei Vergleichskurven erstellt, wobei die %-Werte Restthrombin jedes Heparinstandards auf normalem Millimeterpapier auf die Ordinate gegenüber der entsprechenden Heparinkonzentration auf der Abszisse aufgetragen wurden (Abb. 6 - 10). Die Heparinkonzentration der Patientenprobe wird direkt von der erstellten Eichkurve abgelesen.

Tab. 3 Calciparin^R (Choay)

Nr.	Heparin U/ml	Restthrombin %						Mittel- wert	Stand.- Abw.
1	0,0	99	99	100	97	98		98,6	1,1
2	0,05	89	88	89	87	84		87,4	2,0
3	0,075	80	82	78	80	80		80,0	1,4
4	0,1	73	75	74	75	73		74,0	1,0
5	0,2	53	52	53	51	54		52,6	1,1
6	0,4	20	19	19	19	20		19,4	0,5
7	0,8	4	3	2	5	1		3,0	1,6

Charge 1

Nr.	Heparin U/ml	Restthrombin %						Mittel- wert	Stand.- Abw.
1	0,0	97	98	101	97	100		98,6	1,8
2	0,05	87	87	85	84	87		86,0	1,4
3	0,075	80	77	84	75	76		78,4	3,6
4	0,1	71	73	74	78	70		73,2	3,1
5	0,2	51	55	52	50	48		51,2	2,6
6	0,4	18	19	17	15	20		17,8	1,9
7	0,8	3	2	2	1	3		2,2	0,8

Charge 2

Tab. 4 Thrombophob^R (Nordmark)

Nr.	Heparin U/ml	Restthrombin %						Mittel- wert	Stand.- Abw.
1	0,0	99	101	103	99	101		100,6	1,6
2	0,05	92	89	91	90	91		90,6	1,1
3	0,075	85	87	86	86	85		85,8	0,8
4	0,1	79	81	82	79	79		80,0	1,4
5	0,2	48	48	47	49	48		48,0	0,7
6	0,4	22	25	26	23	22		23,6	1,8
7	0,8	4	6	5	4	4		4,6	0,9

Charge 1

Nr.	Heparin U/ml	Restthrombin %						Mittel- wert	Stand.- Abw.
1	0,0	100	102	101	99	100		100,4	1,1
2	0,05	88	93	92	91	89		90,6	2,1
3	0,075	86	85	87	88	84		86,0	1,6
4	0,1	82	81	83	78	83		81,4	2,1
5	0,2	53	51	51	48	51		50,8	1,8
6	0,4	19	17	19	20	17		18,4	1,3
7	0,8	3	4	4	5	2		3,6	1,1

Charge 2

Tab. 5 Heparin Riker (Kettelhack Riker)

Nr.	Heparin U/ml	Restthrombin %					Mittel- wert	Stand.- Abw.
1	0,0	102	96	99	97	101	98,5	2,6
2	0,05	87	84	88	84	86	85,8	1,7
3	0,075	78	82	85	79	81	81,2	2,5
4	0,1	70	77	73	76	71	73,4	3,0
5	0,2	50	47	46	51	45	47,8	2,6
6	0,4	19	24	23	27	21	22,8	3,0
7	0,8	7	9	10	6	9	8,2	1,6

Charge 1

Nr.	Heparin U/ml	Restthrombin %					Mittel- wert	Stand.- Abw.
1	0,0	101	97	98	99	97	98,4	1,7
2	0,05	86	88	84	88	84	86,0	2,0
3	0,075	80	81	86	78	80	81,0	3,0
4	0,1	71	78	72	76	74	74,2	2,9
5	0,2	51	49	50	54	48	50,4	2,3
6	0,4	18	21	20	24	19	20,4	2,3
7	0,8	7	7	5	6	9	6,8	1,5

Charge 2

Tab. 6 Heparin-Natrium (Braun Melsungen)

Nr.	Heparin U/ml	Restthrombin %					Mittel- wert	Stand.- Abw.
1	0,0	99	100	101	103	98	100,2	1,9
2	0,05	93	90	98	92	91	92,8	3,1
3	0,075	80	82	83	80	81	81,2	1,3
4	0,1	71	70	73	71	70	71,0	1,2
5	0,2	43	44	41	43	42	42,6	1,1
6	0,4	9	10	8	8	9	8,8	0,8
7	0,8	1	2	1	2	1	1,4	0,5

Charge 1

Nr.	Heparin U/ml	Restthrombin %					Mittel- wert	Stand.- Abw.
1	0,0	99	102	101	99	102	100,6	1,5
2	0,05	96	90	93	92	93	92,8	2,2
3	0,075	82	83	86	80	82	82,6	2,2
4	0,1	73	76	70	76	73	73,6	2,5
5	0,2	43	41	41	44	40	41,8	1,6
6	0,4	8	9	8	8	9	8,4	0,5
7	0,8	1	2	3	1	1	1,6	0,9

Charge 2

Tab. 7 Liquemin^R (Roche)

Nr.	Heparin U/ml	Restthrombin %					Mittel- wert	Stand.- Abw.
1	0,0	100	103	99	104	101	101,4	2,1
2	0,05	83	80	86	86	81	83,2	2,7
3	0,075	74	73	72	74	73	73,2	0,8
4	0,1	66	63	63	65	67	64,8	1,7
5	0,2	51	50	49	53	47	50,0	2,2
6	0,4	24	26	25	24	26	25,0	1,0
7	0,8	3	2	4	0	1	2,0	1,6

Charge 1

Nr.	Heparin U/ml	Restthrombin %					Mittel- wert	Stand.- Abw.
1	0,0	100	104	98	101	101	100,8	2,2
2	0,05	87	88	96	92	85	89,6	4,3
3	0,075	82	79	85	83	80	81,8	2,4
4	0,1	65	64	60	66	63	63,6	2,3
5	0,2	49	42	46	43	45	45,0	2,7
6	0,4	22	20	23	19	24	21,6	2,0
7	0,8	2	2	0	1	4	1,8	1,5

Charge 2

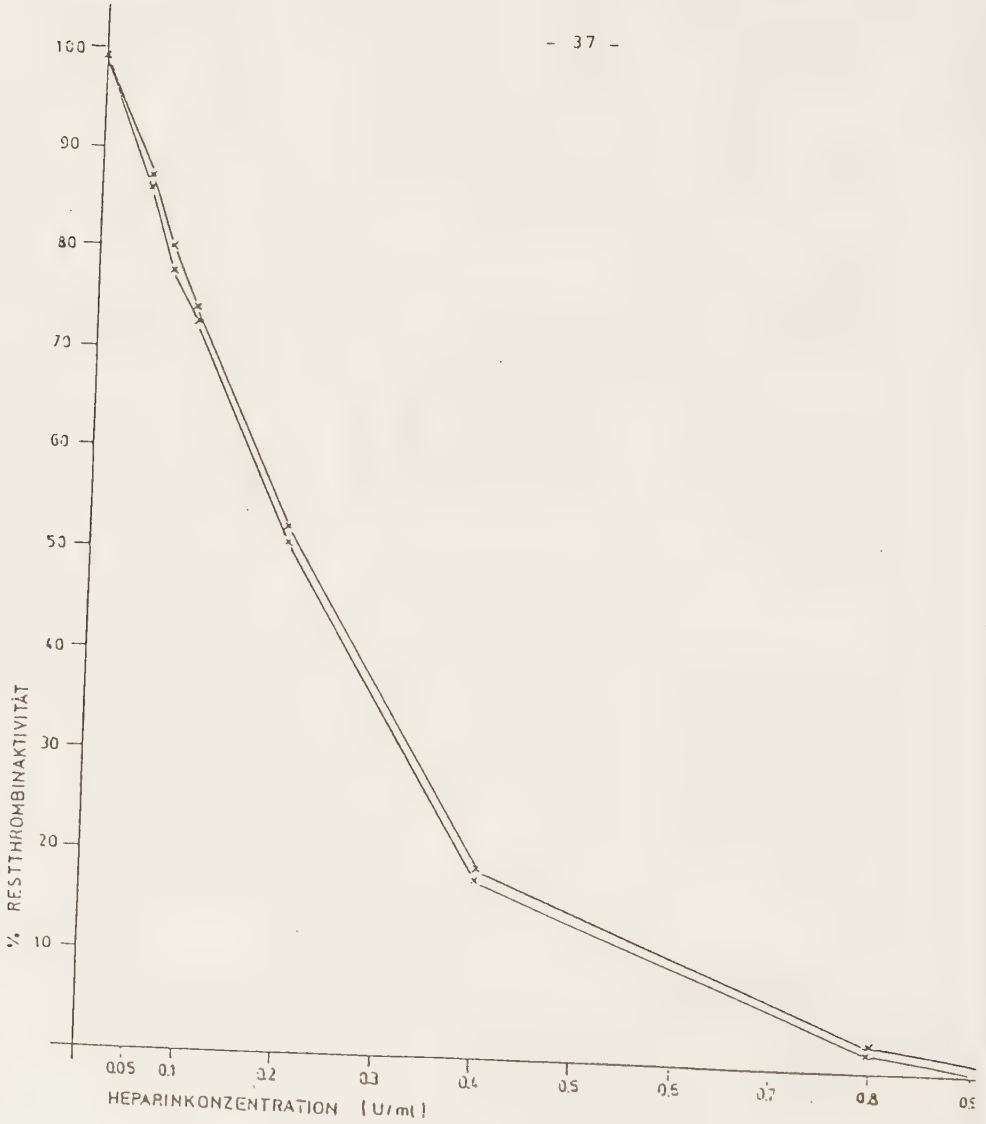


Abb.: 6 Calciparin[®] (Choay)

Calciparin[®]-Bezugskurven mit unterschiedlichen Chargennummern
(vergl.: Tab. 3)

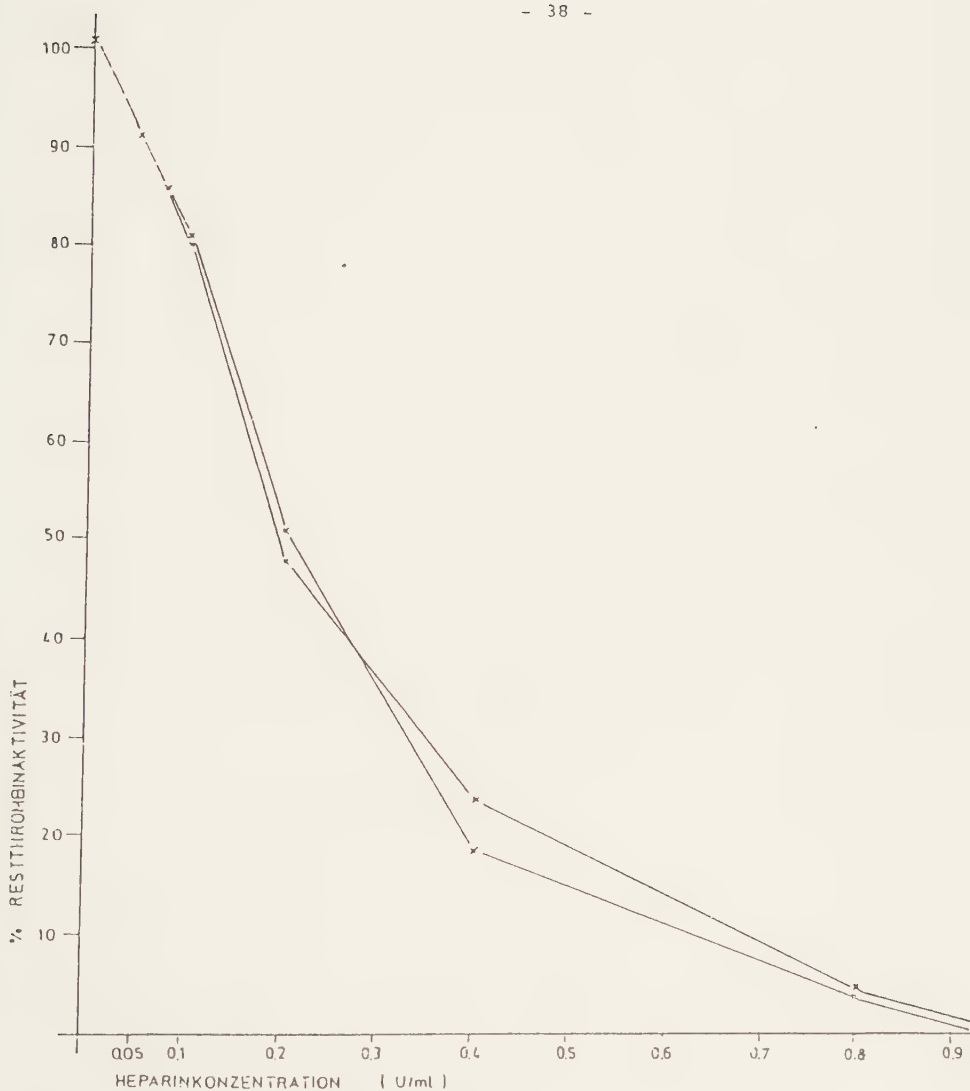


Abb.: 7 Thrombophob[®] (Nordmark)

Thrombophob^R-Bezugskurven mit unterschiedlichen Chargennummern
(vergl.: Tab. 4)

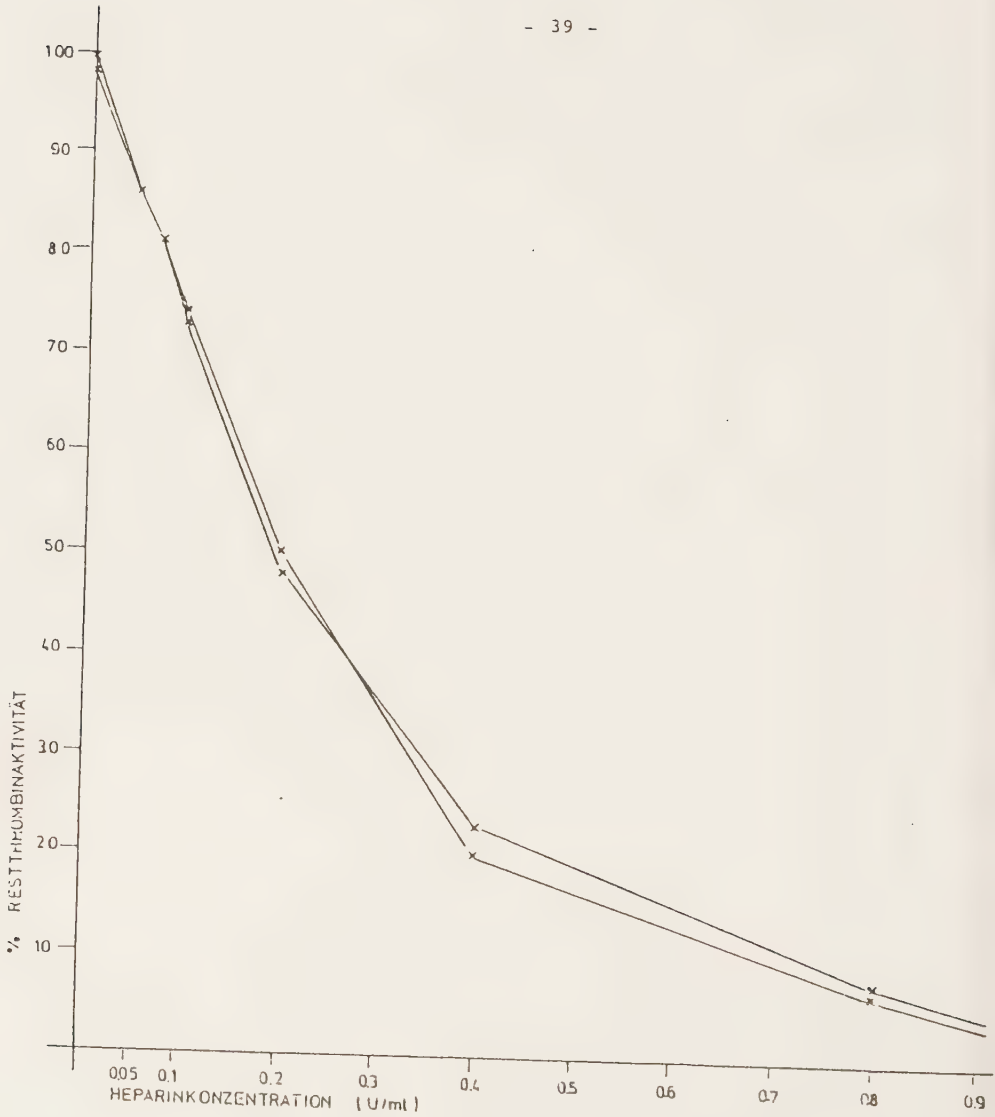


Abb.: 8 Heparin Riker (Kaltuthack Riker)
Heparin Riker-Bezugskurven mit unterschiedlichen Chargennummern
(vergl.: Tab. 5)



Abb.: 9 Heparin-Natrium (Braun Melsungen)

Heparin Natrium-Bezugskurven mit unterschiedlichen Chargennummern

(vergl.: Tab. 6)

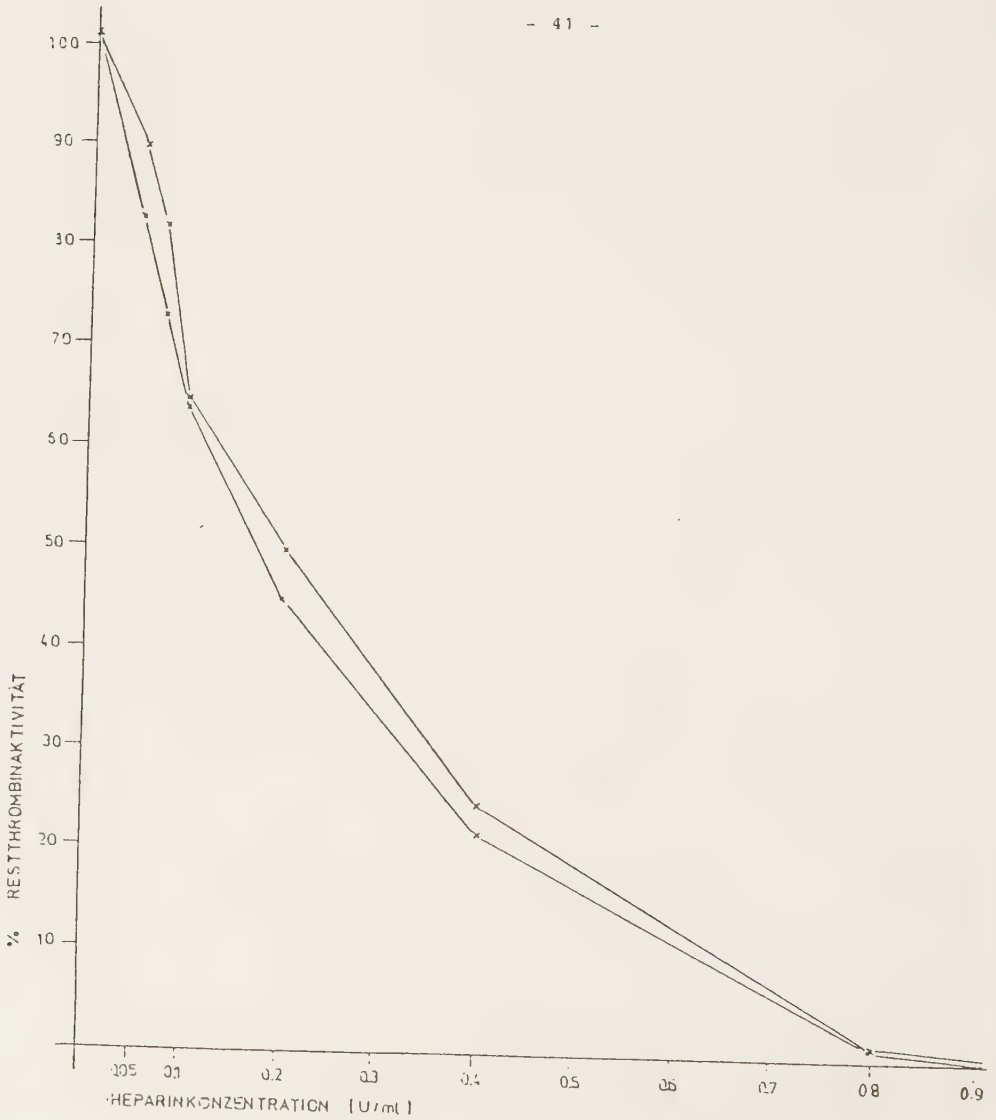


Abb.: 10 Liquemin[®] (Roche)

Liquemin^R-Bezugskurven mit unterschiedlichen Chargennummern
(vergl.: Tab. 7)

3.6.8 Instrumentenkontrolle und Eichungstechnik

1. Die Selektionstaste A für die Heparinbestimmung wird gedrückt. Die Taste Hintergrundnorm wird gedrückt, um das Instrument auf Hintergrund-Null einzustellen.
2. Bei geschlossenem Deckel (Schiebeplatte) und ohne Küvette im Strahlengang werden die folgenden Digitalablesungen durch Druck auf die entsprechenden Tasten vorgenommen: Temp.-Kontrolle, Lampenkontrolle und Anzeigenkontrolle. Die Funktion dieser Tasten und die annehmbaren Werte sind im Instrumentenmanual beschrieben.
3. Die Taste Messzeit Ein wird gedrückt. Mit den Schaltern S 1 der Hilfsschalttafel (hinter dem abnehmbaren Deckel am rechten oberen Rand der Frontplatte) wird eine Meßzeit von 186 Sekunden gewählt (alle Schalter auf on = 186 Sekunden).
4. Das feste Referenzmaterial wird in den Strahlengang gesetzt und die Taste Hintergrundmessung solange gedrückt, bis sich die Digitalanzeige stabilisiert. Der Wert wird notiert und das Referenzmaterial herausgenommen. Wenn die Eichung nicht verändert wird, sollte der Wert mit dem Referenzmaterial ziemlich konstant (± 003) bleiben.
5. Um einen Heparin-Leerwert (Null-Standard, z.B. für Eichungskontrolle) vorzubereiten, werden 0,2 ml Citratplasmareagenz in ein vorgewärmtes Röhrchen gegeben und 1 - 2 Minuten auf 37° C erwärmt.
6. 5 µl des Plasmapools ohne Heparin (Null-Standard) werden in das Röhrchen mit dem Citratplasmareagenz gegeben.
7. 50 µl Thrombinreagenz werden zugegeben und gemischt. Gleichzeitig wird die Stoppuhr in Gang gesetzt. Durch leichtes Schütteln wird gemischt und das Röhrchen wieder ins Wasserbad gesetzt.

8. Nach genau 60 Sekunden wird der Inhalt einer vorgewärmten Küvette in das Röhrchen gegossen. Das Reaktionsgemisch wird dann sofort wieder in die Küvette zurückgegeben.

Anmerkung

Wird statt eines Heparinpräparats aus Mukosa ein Lungenheparinpräparat verwendet, sollte die Inkubationszeit auf 120 Sekunden verlängert werden, um eine ungefähr gleich große Empfindlichkeit der Heparinkurve zu erreichen.

9. Die Küvette wird in den Strahlengang gesetzt und der Deckel geschlossen.
10. Die Tasten Messzeit Ein und Messung werden gedrückt. Die Digitalanzeige wird nun während der Meßperiode blinken. Sobald das Blinken aufhört, wird der angezeigte Wert abgelesen und notiert.

Anmerkung

Der angezeigte Wert sollte annähernd konstant bleiben. Sollte es wegen schwankender Werte (± 3) schwierig sein, den richtigen Wert abzulesen, kann durch Druck auf die Taste Dämpfung ein eine Verbesserung erzielt werden. Warten, bis sich der Wert stabilisiert und dann ablesen. Die häufigste Ursache einer solchen Instabilität sind Zellstoffasern, Staub oder andere Partikel in der Küvette.

11. Für den Heparin-Leerwert sollten 100 ± 5 abgelesen werden. Ist der Wert nicht 100 ± 5 , dann Leerwert wiederholen. Ergibt der neue Ansatz nicht 100 ± 5 , dann muß die Feineinstellschraube der vorderen Hilfsschalttafel (unter dem abnehmbaren Deckel der Frontplatte am rechten oberen Rand) für den Selektor A justiert werden, bis der Wert 100 ± 5 beträgt. Wird das Potentiometer im Uhrzeigersinn gedreht, erhöht sich der angezeigte Wert, entgegen dem Uhrzeigersinn vermindert sich der Wert. Sind nur geringe Justierungen nötig, so können diese direkt vorgenommen werden. Ist eine größere Neueichung notwendig, kann das feste Referenzmaterial wie folgt zur Eichung verwendet werden:

- a) Der benötigte Wert für das feste Referenzmaterial wird nach folgender Formel errechnet:

$$\frac{(\text{gewünschter Heparin-Leerwert})}{(\text{abgelesener Heparin-Leerwert})} \times \text{abgelesener Wert des festen Referenzmaterials}$$

= benötigte Ablesung für festes Referenzmaterial

Beispiel

$$\begin{aligned} \text{Gewünschter Heparin-Leerwert} &= 100 \text{ (+ 5)} \\ \text{abgelesener Wert} &= \text{erhaltener Wert mit Heparin-Leerwertansatz (s. Punkt 11. Instrumentenkontrolle u. Eichungstechnik, Kap. 3.6.8)} \\ \text{abgelesener Wert des festen Referenzmaterials} &= \text{abgelesen nach Punkt 4. der Instrumentenkontrolle (s. Kap. 3.6.8)} \end{aligned}$$

- b) Das feste Referenzmaterial wird in den Strahlengang gesetzt. Während Hintergrundmessung gedrückt wird, wird die Feineinstellschraube für den Selektor A justiert, bis der für das feste Referenzmaterial erforderliche Wert angezeigt wird.
- c) Der Heparin-Leerwert wird wiederholt und wenn nötig, eine letzte Feineinstellung auf 100 ± 5 vorgenommen.

3.6.9 Messung der Heparinstandards, der Heparin-Control und der Patientenplasmen

1. 0,2 ml Citratplasmareagenz werden in ein vorgewärmtes Röhrchen gegeben und 1 - 2 Minuten auf 37 °C erwärmt.
2. 5 µl des 0,1 U/ml Heparinstandards werden zum vorgewärmten Citratplasma gegeben.

Anmerkung

Genaue, reproduzierbare Heparinwerte können nur mit höchst genauen Präzisionspipetten und sorgfältiger Technik erzielt werden.

3. 50 µl Thrombinreagenz werden ins Röhrchen gegeben und durch leichtes Schütteln gemischt, gleichzeitig wird die Stoppuhr in Gang gesetzt. Das Röhrchen wird im Wasserbad stehengelassen.
4. Nach genau 60 Sekunden wird der vorgewärmte Inhalt einer Küvette in das Röhrchen gegossen. Das Reaktionsgemisch wird dann sofort in die Küvette zurückgegossen.

Anmerkung

Wird statt eines Heparinpräparates aus Mukosa ein Lungenheparinpräparat verwendet, sollte die Inkubationszeit auf 120 Sekunden verlängert werden.

5. Die Küvette wird in den Strahlengang gesetzt, der Deckel geschlossen, und die Tasten Messzeit Ein und Messung werden gedrückt. Die Digitalanzeige wird abgelesen, wenn die Meßzeit abgelaufen ist. Dieser Wert entspricht der Veränderung der relativen Fluoreszenz infolge der Freisetzung von AIE aus dem Substrat. Das Instrument ist so geeicht, daß diese Veränderung als Prozent Restthrombin ausgedrückt wird. Die Punkte 1 - 5 mit den übrigen Heparin-Standards werden wiederholt.

Anmerkung

Jede Probe wird einzeln getestet. Während der Meßzeit eines Tests können für den nächsten Test 0,2 ml Citratplasmareagenz pipettiert und vorgewärmt werden.

6. Die Punkte 1 - 5 werden nun für die Heparinkontrolle mit 5 µl Heparin-Control durchgeführt. Der Wert muß innerhalb des angegebenen Bereichs liegen. Liegt der Wert außerhalb des Kontrollbereichs, wird der Test noch einmal neu angesetzt, bevor eine Neueichung vorgenommen wird.
7. Die Punkte 1 - 5 werden mit je 5 µl Patientenplasma durchgeführt.

3.6.10 Messung der Antithrombin-III-Aktivität im Plasma mit synthetischem Substrat

Prinzip

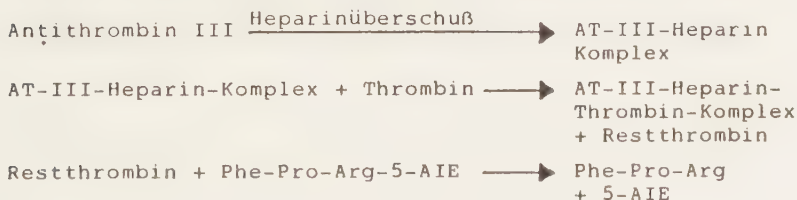
Wie Heparin-Bestimmung (s. Kap. 3.6.4).

Die Antithrombin-III-Aktivität im Plasma wird indirekt gemessen, indem Thrombin mit dem Patientenplasma und Heparin inkubiert wird und anschließend die Restthrombinaktivität gemessen wird. Die Restthrombinaktivität wird dann anhand folgender Formel in Prozent inhibiertes Thrombin umgerechnet:

$$\% \text{ inhibiertes Thrombin} = \frac{\text{Reagenzien-Leerwert-Probenwert}}{\text{Reagenzien-Leerwert}} \times 100$$

Der Wert im Patientenplasma wird als Prozent vom Wert eines Normalplasmapools umgerechnet.

Der chemische Vorgang der Protocath Antithrombin-III-Bestimmung mit synthetischem Substrat läßt sich wie folgt darstellen:



3.6.11 Material zur Durchführung der Tests

Reagenziensatz (Merz und Dade, München)

- Heparinreagenz
- Thrombinreagenz
- Thrombinsubstrat-Küvetten

Zusätzlich notwendiges Material

1. Normalplasmapool zur Erstellung normaler Antithrombin-III-Werte
 2. Kunststoffröhrchen (12 x 75 mm) zur Verdünnung der Plasmaproben und für die Vorinkubation des Plasmas mit Heparin und Thrombin.
 3. Stoppuhr
 4. 2,0 ml, 1,0 ml, 0,2 ml, 0,1 ml-Glas- und Eppendorf-Pipetten und eine 5 µl-Präzisionspipette (SMI-Pipette)
 5. Bidestilliertes Wasser
 6. Wasserbad mit 37 °C
 8. Eisbad, um die Thrombinlösung bei 2 - 8 °C aufzubewahren.
 9. Zellstofftücher
- Anmerkung
Um genaue und reproduzierbare Werte zu erzielen, müssen höchst präzise Pipetten und eine sorgfältige Technik angewandt werden.

3.6.12 Ausführung

Herstellung des Normalplasmapools, Anlösen der Reagenzien und Probenverdünnungen.

1. Bei geschlossenem Deckel (Schiebeplatte) wird das Protopath Fluorometer eingeschaltet. Das Instrument muß vor Gebrauch auf 37,5 °C ($\pm 0,2$) vorgewärmt werden, was ca. 45 Minuten dauert.
2. Zum Vorwärmen werden mehrere Kunststoffröhrchen (12 x 75 mm) in das Wasserbad oder in den Thermoblock gestellt.

3. Für den Antithrombin-III-Normalwert wird ein Normalplasmapool hergestellt. Dazu wird Blut von 10 gesunden männlichen Spendern wie unter Blutentnahme beschrieben abgenommen. In einem Kunststoffröhrchen werden die einzelnen abgetrennten Plasmen zu gleichen Teilen gemischt. Dieser Plasmapool kann in kleinen Mengen in Kunststoffröhrchen aufgeteilt und bei -70°C 30 Tage aufbewahrt werden.
4. Die gewünschte Zahl Fläschchen mit Thrombinreagenz wird mit destilliertem Wasser gelöst und bei $2 - 8^{\circ}\text{C}$ oder, wenn in Gebrauch, in einem Eisbad aufbewahrt.
5. Ein Fläschchen Prototrol als Kontrolle.
6. Je eine Küvette mit Thrombinsubstrat wird für den Leerwert, den Normalplasmapool, das Prototrol und pro Patient angelöst. Ob nur eine Patientenprobe oder eine Serie von Patientenproben getestet werden, der Leerwert, der Normalplasmapool und die Kontrolle müssen immer mindestens einmal mitgeführt werden. Die Küvetten werden mindestens 10 Minuten, aber nicht länger als eine Stunde vor Gebrauch im Thermoblock des Fluorometers auf 37°C vorgewärmt. Erst in den Strahlengang setzen, wenn das Testgemisch zugesetzt wird. Die gelösten Substanzen werden vor direktem Licht geschützt.
7. Für jede zu testende Probe (Normalplasmapool, Kontrolle und Patientenproben) werden je 2 ml Heparinreagenz in ein entsprechend markiertes 12×75 mm Kunststoffröhrchen pipettiert.
8. 5 μl der entsprechenden Probe werden zu den 2 ml Heparinreagenz gegeben und sorgfältig gemischt.

Anmerkung

Wie auch bei der Heparin-Bestimmung können genaue, reproduzierbare Antithrombin-III-Werte nur dann erzielt werden, wenn höchst präzise Pipetten und eine sorgfältige Technik angewandt werden. Die kritischsten Schritte, die die Antithrombin-III-Resultate beeinflussen, sind die oben erwähnte 5 μl -Pipettierung der Plasmaprobe und die 0,2 ml-Pipettierung der Plasmaverdünnung (Punkt 1. Messung der Plasmaproben).

3.6.13 Instrumentenkontrolle und Eichungstechnik

1. Die Selektionstaste B für die Antithrombin-III-Bestimmung wird gedrückt. Die Taste Hintergrund-Null wird gedrückt, um das Instrument auf Null einzustellen.
2. Mit geschlossener Schiebepplatte und ohne Küvette im Strahlengang werden die folgenden Digitalablesungen vorgenommen und notiert: Temp.-Kontrolle, Lampenkontrolle und Anzeigenkontrolle.
3. Die Taste Messzeit Ein wird gedrückt. Mit den Schaltern S 1 der Hilfsschalttafel hinter dem abnehmbaren Deckel am rechten Rand der Frontplatte wird eine Meßzeit von 186 Sekunden gewählt (alle Schalter auf on = 186 Sekunden).
4. Das feste Referenzmaterial wird in den Strahlengang gesetzt. Die Taste Hintergrundmessung solange gedrückt, bis sich die Digitalanzeige stabilisiert. Der Wert wird notiert und das Referenzmaterial herausgenommen. Wenn die Eichung nicht verändert wird, sollte der Wert des Referenzmaterials konstant (+ 003) bleiben.
5. Um einen Antithrombin-III-Reagenz-Leerwert vorzubereiten, werden 0,2 ml des Heparinreagenz in ein Teströhrchen pipettiert und 1 - 2 Minuten bei 37 °C vorgewärmt.
6. 0,1 ml Thrombinreagenz werden zugegeben und durch leichtes Schütteln gemischt, gleichzeitig wird die Stoppuhr in Gang gesetzt. Das Röhrchen wird im Wasserbad stehengelassen.
7. Nach genau 60 Sekunden wird der Inhalt einer vorgewärmten Küvette in das Röhrchen gegossen und das Reaktionsgemisch dann sofort wieder in die Küvette zurückgegeben.

8. Die Küvette wird in den Strahlengang gesetzt und der Deckel geschlossen.
9. Die Tasten Messzeit Ein und Messung werden gedrückt. Die Digitalanzeige wird nun während der Meßzeit blinken. Sobald das Blinken aufhört, wird der angezeigte Wert abgelesen und notiert.

Anmerkung

Der angezeigte Wert sollte annähernd konstant bleiben. Sollte es wegen schwankender Werte (+ 3) schwierig sein, den richtigen Wert abzulesen, kann durch Druck auf die Taste Dämpfung Ein eine Verbesserung erzielt werden. Warten, bis sich der Wert stabilisiert hat und dann ablesen. Die häufigste Ursache einer solchen Instabilität sind Zellstoffasern, Staub oder andere Partikel in der Küvette.

10. Für den Antithrombin-III-Leerwert sollte 100 ± 5 abgelesen werden. Ist der Wert nicht 100 ± 5 , wird der Leerwert wiederholt. Ergibt der neue Ansatz nicht 100 ± 5 , dann muß die Feineinstellschraube für den Selektor B der vorderen Hilfsschalttafel (hinter dem abnehmbaren Deckel am rechten oberen Rand der Frontplatte) justiert werden, bis der Wert 100 ± 5 beträgt. Wird das Potentiometer im Uhrzeigersinn gedreht, erhöht sich der angezeigte Wert, entgegen dem Uhrzeigersinn vermindert sich der Wert. Sind nur geringe Justierungen nötig, kann dies direkt gemacht werden. Ist eine größere Neueichung notwendig, kann das feste Referenzmaterial wie folgt zur Eichung verwendet werden:

- a) Die benötigte Ablesung wird für das feste Referenzmaterial nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{(gewünschter Wert des AT-III-Leerwerts)}}{\text{(abgelesener Wert des AT-III-Leerwerts)}} \times \text{abgelesener Wert des festen Referenzmaterials}$$

= benötigte Ablesung für festes Referenzmaterial

Beispiel

Gewünschter
AT-III-Leerwert = 100 ± 5
Abgelesener Wert = erhaltener Wert mit Antithrombin-III-Leerwert
(s. Punkt 10.)

Abgelesener Wert
des festen Referenzmaterials = abgelesen nach Punkt 4.
der Instrumentenkontrolle

- b) Das feste Referenzmaterial wird in den Strahlengang gesetzt. Während die Taste Hintergrundmessung gedrückt wird, wird die Feineinstellschraube für den Selektor B justiert, bis der für das feste Referenzmaterial benötigte Wert angezeigt wird.
- c) Der Antithrombin-III-Leerwert wird wiederholt und wenn nötig eine letzte Feineinstellung auf 100 ± 5 gemacht.

3.6.14 Messung der Plasmaproben

1. Für die Messung des Normalplasmapools oder der Patientenplasmen werden 0,2 ml der entsprechenden Verdünnung in ein vorgewärmtes 12 x 75 mm Kunststoffröhrchen gegeben und 1 - 2 Minuten auf 37 °C erwärmt.
2. 0,1 ml Thrombinreagenz werden zugegeben und durch leichtes Schütteln gemischt, gleichzeitig wird die Stoppuhr in Gang gesetzt und das Röhrchen wieder ins Wasserbad zurückgestellt.
3. Nach genau 60 Sekunden wird der Inhalt einer vorgewärmten Küvette in das Röhrchen gegossen und das Reaktionsgemisch dann sofort wieder in die Küvette zurückgegeben.
4. Die Küvette wird in den Strahlengang des Fluorometers eingesetzt, der Deckel geschlossen, und die Ta-

sten Messzeit Ein und Messung werden gedrückt. Nach Abschluß der Meßzeit wird die Digitalanzeige abgelesen. Punkt 1 - 4 wird für alle Proben durchgeführt.

Anmerkung

Jede Probe wird einzeln getestet. Während der Meßzeit eines Tests können für den nächsten Test 0,2 ml in ein vorgewärmtes Kunststoffröhrchen überpipettiert und vorgewärmt werden.

Resultate

Der erhaltene Wert entspricht der Veränderung der relativen Fluoreszenz infolge der Freisetzung von AIE aus dem Substrat. Das Instrument ist so geeicht, daß diese Veränderung proportional zur Menge des nicht gehemmten Thrombins im Reaktionsgemisch ist.

Die Inhibitionsaktivität jeder Plasmaprobe wird nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ inhibiertes Thrombin} = \frac{\text{Reagenzien-Leerwert-Probenwert}}{\text{Reagenzien-Leerwert}} \times 100$$

Beträgt der Reagenzien-Leerwert 100, so ergibt sich der Prozentwert inhibierten Thrombins einfach aus $100 - \text{Probenwert}$.

Das inhibierte Thrombin wird dann mit einem Normalplasma verglichen, um so die Aktivität als Prozent des Normalplasmas zu ermitteln.

Anmerkung

Thrombin wird im Überschuß der Reaktion zugesetzt; es ist bei normalem Antithrombin-III-Gehalt noch eine Restthrombinaktivität meßbar.

Die Prozent-Aktivität des Normalplasmas wird wie folgt berechnet:

$$\text{Antithrombin III} = \frac{\% \text{ inhib. Thrombin(Probe)}}{\% \text{ inhib. Thrombin (Normalplasma)}} \times 100$$

Normalwerte: 85 - 115 % vom Normalplasma

4. PATIENTEN

52 Patienten des Klinikums Großhadern in München wurden mit Heparin verschiedener Hersteller behandelt. Es handelte sich um Patienten mit tiefer Bein- oder Beckenvenenthrombose und/oder Lungenembolie, Patienten die prophylaktisch mit Heparin behandelt wurden, Patienten mit Verbrauchskoagulopathie, unter Hämodialyse und Kranke, die im Rahmen eines kardio-chirurgischen Eingriffs an einen extrakorporalen Kreislauf angeschlossen waren.

Bei allen Patienten wurden die Heparinkonzentration, das Antithrombin III, die aktivierte partielle Thromboplastinzeit, die Thrombinzeit und das Fibrinogen bestimmt. Dabei wurden 195mal die aktivierte partielle Thromboplastinzeit und 98mal die Thrombinzeit den entsprechenden gemessenen Heparinkonzentrationen zugeordnet. Darunter waren 42 Bestimmungen bei einer Tagesdosis unter 20.000 Einheiten Heparin pro Tag. Das Heparin wurde entweder durch kontinuierliche intravenöse Infusion mittels Perfusor über 24 Stunden als Bolus oder subkutan zweibis dreimal am Tag verabreicht. Bei den Hämodialysen wurden 24 Heparinbestimmungen und bei den 10 Herzoperationen 60 Messungen durchgeführt.

Bei den Patienten, die sich einer Operation am offenen Herzen unterzogen, wurde das Blut vor Beginn des extrakorporalen Kreislaufs, 10 Minuten nach Bolusinjektion von 375 IE Heparin/kg KG und 60 Minuten danach entnommen. Weitere Messungen wurden 10, 30 und 120 Minuten nach Protamin-Neutralisierung durchgeführt. Die Patienten erhielten einheitlich Heparin-Natrium (Braun-Melsungen).

Es wurden bei 4 Patienten, die sich wegen chronischen Nierenversagens zwei- bis dreimaligen Dialysebehandlungen unterziehen mußten, an zwei aufeinanderfolgenden Dialysen Blutproben entnommen und untersucht. Die in die Untersuchung einbezogenen Patienten erhielten einheitlich initial 3.000 IE Heparin (Heparin-Natrium, Brauns-Melsungen). Anschließend wurden 1.200 IE/Stunde kontinuierlich appliziert. Es wurde jeweils einheitlich über einen Zeitraum von 5 Stunden dialysiert. Die Blutentnahme erfolgte vor Beginn der Dialyse, nach Bolusinjektion (3.000 IE Heparin), nach 2 1/2 Stunden und nach 5 Stunden.

Sowohl bei den Patienten mit extrakorporalem Kreislauf als auch bei Patienten unter Hämodialyse wurden außer der Heparinkonzentration das Antithrombin III, die Thrombinzeit, die aktivierte partielle Thromboplastinzeit und das Fibrinogen bestimmt.

5. ERGEBNISSE

5.1 Heparinstandardkurven

Wie aus den Abbildungen 6 - 10 ersichtlich, verlaufen die Kurven desselben Heparins mit unterschiedlicher Chargennummer fast deckungsgleich. Hingegen zeigt die Abbildung 11, wie sich Heparine verschiedener Hersteller in manchen Konzentrationsbereichen zum Teil sehr geringfügig, in anderen Konzentrationsbereichen jedoch sehr erheblich unterscheiden.

Man erkennt, daß die Restthrombinaktivitäten der 5 geprüften kommerziellen Heparine zum Teil stark differieren. So findet man einen fast übereinstimmenden Kurvenverlauf von Liquemin^R (Roche) und Thrombophob^R (Nordmark) im Bereich von 0,2 und 0,8 U/ml Heparin. Eine starke Abweichung findet sich zum Beispiel zwischen Liquemin^R (Roche) und Thrombophob^R (Nordmark) im Bereich von 0,1 U/ml Heparin, die Differenz der Restthrombinaktivität beträgt hier 16,5 %, sowie im Bereich von 0,4 U/ml Heparin zwischen Liquemin^R (Roche) und Heparin-Natrium (Braun-Melsungen); hier beträgt die Abweichung der Restthrombinaktivität 14,7 % (Abb. 11, Tab. 8).

Tab. 8 Restthrombinwerte in % der verschiedenen Heparine, ermittelt aus jeweils 2 unterschiedlichen Chargen

Heparin U/l	% Restthrombinaktivität				
	Liquemin ^R	Heparin- Natrium	Thrombo- phob ^R	Heparin Riker	Calci- parin ^R
0,0	101,1	100,4	100,5	98,5	98,6
0,05	84,9	92,8	90,6	85,9	86,7
0,075	77,5	81,9	85,9	81,1	79,2
0,1	64,2	72,3	80,7	73,8	73,6
0,2	47,5	42,2	49,4	49,1	51,9
0,4	23,3	8,6	21,0	21,6	18,6
0,8	1,9	1,5	4,1	7,5	2,6



Abb. 11 Liquemin[®] (Roche) —————
 Heparin-Natrium (Braun Melsungen) - - - - -
 Thrombophob[®] (Nordmark) - . - . - .

Vergleichskurven von drei kommerziellen Heparinen (wegen der Übersichtlichkeit sind nur drei der fünf von uns untersuchten Heparine aufgezeichnet, vgl. Tab. 8)

5.2 Statistische Analyse

Annahme: Eine strukturelle Beziehung zwischen der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit, der Thrombinzeit und der Heparinkonzentration im Plasma kann ausreichend durch eine einfache exponentielle Funktion angenähert werden (52).

$$y = y_0 e^{kx}$$

wobei: y = Gerinnungszeit

x = Heparinkonzentration

k = Steigung der Geraden

y_0 = Wert von y bei $x = 0$

Alle Heparinkonzentrationen werden in USP U/ml ausgedrückt. Nach Umwandlung von y in den natürlichen Logarithmus können die Werte einer linearen Regressionsanalyse unterworfen werden.

$$\ln y = \ln y_0 + kx$$

Bei Schwankungen der x -Werte (Δx) und y -Werte bei einem Patienten folgt die Beziehung:

$$\ln y_1 = \ln y_0 + kx_1$$

$$\ln y_2 = \ln y_0 + kx_2$$

$$\ln y_1 - \ln y_2 = \Delta \ln y = kx_1 - kx_2 = k \cdot \Delta x$$

Daraus folgt eine Gerade mit der Steigung k (52). Den ansteigenden Werten der Heparinkonzentrationen werden die entsprechenden gemessenen aktivierten partiellen Thromboplastinzeit- und Thrombinzeit-Werte zugeordnet; es werden die Standardabweichungen und die Mittelwerte berechnet. Die Steigung der Geraden wird angegeben.

5.3 Heparin-aPTT-Beziehung (Abb. 11, Tab. 9)

34 Heparinkonzentrationen wurden 195 Gerinnungszeiten der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit zugeordnet und einer linearen Regressionsanalyse unterworfen (Abb. 12, Tab. 9).

Tab. 9 Heparin-aPTT-Beziehung
Mittelwerte und Standardabweichungen der aPTT bei ansteigenden Heparinkonzentrationen

Heparin U/ml	Zahl der aPTT- Bestimmungen	aPTT Log.(sec) Mittelwerte	Standard- abweichung
0,00	29	3,641	0,08
0,01	1	3,738	-
0,02	1	3,892	-
0,03	2	3,749	-
0,05	9	3,682	0,16
0,06	5	3,764	0,17
0,07	5	3,767	0,15
0,08	5	3,891	0,38
0,09	5	3,957	0,30
0,10	3	3,738	0,22
0,12	6	3,843	0,16
0,14	6	3,797	0,15
0,16	6	3,858	0,28
0,18	4	3,957	0,22
0,20	4	4,210	0,26
0,22	3	4,010	0,10
0,25	3	4,057	0,10
0,28	3	4,102	0,10
0,32	4	4,296	0,30
0,35	4	4,408	0,46
0,36	5	4,364	0,21
0,38	6	4,460	0,47
0,40	6	4,306	0,18
0,42	3	4,391	0,15
0,48	2	4,670	-
0,55	7	4,570	0,43
0,57	4	4,718	0,16
0,60	2	4,941	-
0,64	2	4,941	-
0,70	7	4,979	0,38
0,75	4	5,124	0,18
0,80	15	5,084	0,17
0,85	10	5,181	0,08
0,90	14	5,226	0,14

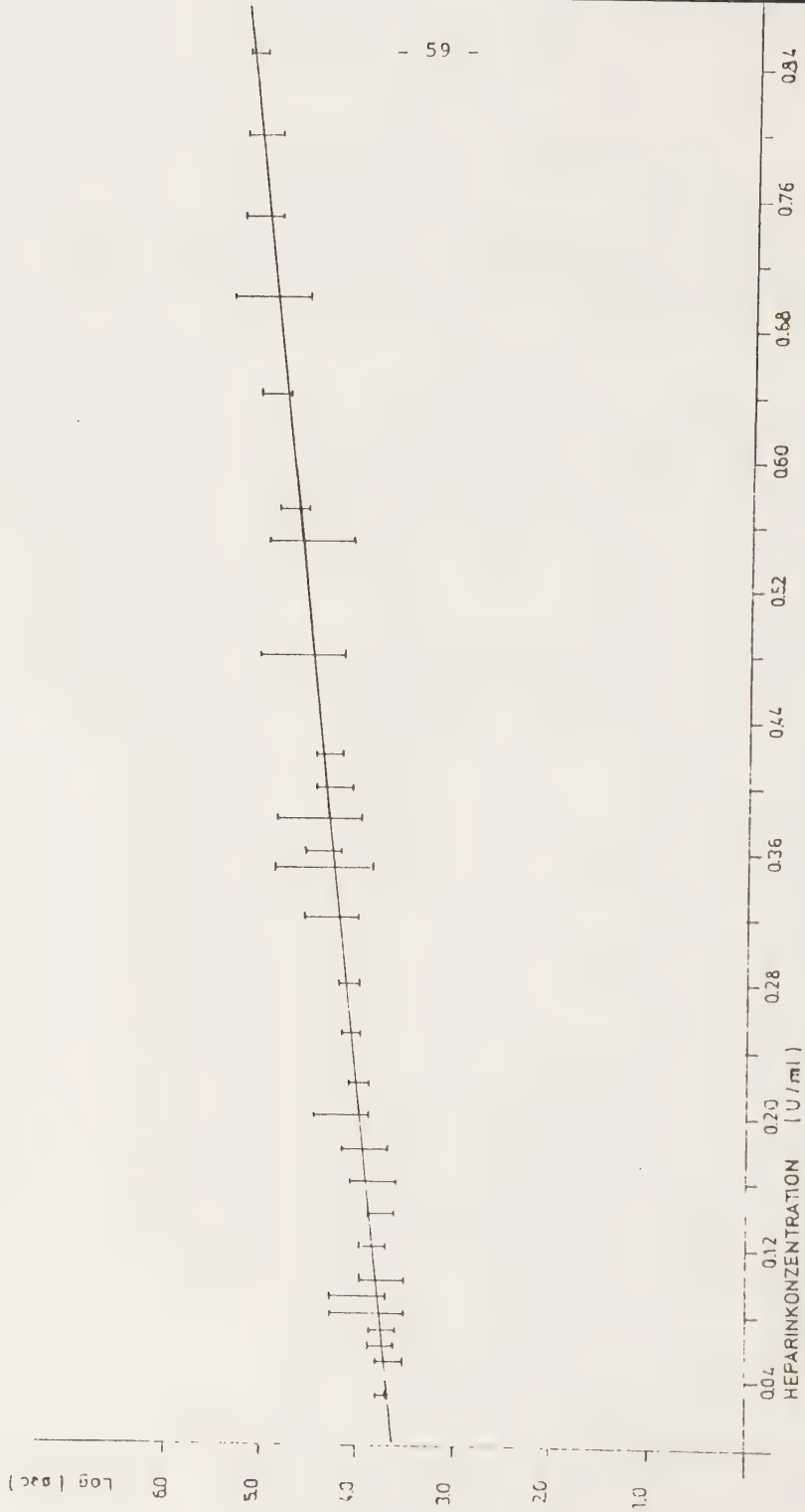


Abb. 12 aPTT-Heparin-Beziehung
 Darstellung der Regressionsgeraden $y = 3,673 + 1,835 \cdot x$
 x = Heparinkonzentration (U/ml) $\hat{y}$ = aPTT (Log. (sec))

Mittel aller aPTT-Werte:	4,274
Standardabweichung der aPTT-Werte:	0,503
Korrelationskoeffizient zwischen Heparin- konzentration und aPTT-Gerinnungszeiten:	0,983
Streuung der aPTT-Werte um die Regressionsgerade:	0,09

Gleichung der Regressionsgeraden: $y = 3,673 + 1,853 \cdot x$

Legt man die bei uns im Labor übliche Normalzeit für die aktivierte partielle Thromboplastinzeit von 30 - 46 Sekunden zugrunde, so kann mit dem von uns benützten aPTT-Reagenz statistisch eine sichere Veränderung der Gerinnungszeit erst ab einer Konzentration von 0,13 U/ml im Patientenplasma festgestellt werden. Der aus 5 Gerinnungszeiten errechnete Mittelwert für die Konzentration 0,12 U/ml liegt bei 46,6 Sekunden, also gerade außerhalb des Normalbereichs. Im Bereich hoher Konzentrationen kommt es zu erheblichen Schwankungen der Gerinnungszeiten. Von 15 gemessenen Werten zwischen 0,6 und 0,8 konnte ein Wert (6 %) nicht gemessen werden, und bei Konzentrationen zwischen 0,8 und 0,9 waren bei 39 Bestimmungen 7 nicht meßbar (18 %), das heißt 24 % der Werte zwischen 0,6 und 0,9 waren demnach mit der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit nicht bestimmbar.

Bei Konzentrationen über 0,9 konnte keine Gerinnungszeit mehr ermittelt werden; ein Gerinnungsendpunkt läßt sich mit dem Koagulometer nach Schnitger und Gross nicht mehr erreichen. Die Bestimmungen wurden daher nach 250 Sekunden abgebrochen.

Nur 24 % unserer Fälle mit nachgewiesener Heparinisierung zeigten eine Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit im Bereich von 0,01 - 0,09. Mithin wurden 76 % der

heparinisierten Patienten nicht mit dieser Methode erfaßt. Im höheren therapeutischen Bereich reagierte die aktivierte partielle Thromboplastinzeit allerdings gut, und es wurden Konzentrationen zwischen 0,1 - 0,9 mit ausreichender Sicherheit erfaßt.

5.4 Heparin-Thrombinzeit-Beziehung

(Abb. 13, Tab. 10)

Es wurden 19 Heparinkonzentrationen 89 Thrombinzeitwerten zugeordnet (Abb. 13, Tab. 10).

Mittel aller TZ-Werte: 3,541

Standardabweichung aller TZ-Werte: 0,409

Korrelationskoeffizient zwischen Heparinkonzentration und Thrombinzeit: 0,911

Streuung der TZ-Werte um die Regressionsgerade: 0,17

Gleichung der Regressionsgeraden: $y = 3,050 + 3,920 \cdot x$

Wir konnten, wenn man die in unserem Labor ermittelten Thrombinzeit-Normalwerte von 16 - 22 Sekunden voraussetzt, eine statistisch signifikante Veränderung der Gerinnungszeiten ab 0,05 U/ml Heparin feststellen. Ab 0,3 U/ml Heparin versagt diese Methode. Die Messungen wurden dann üblicherweise nach 100 Sekunden auf dem Koagulometer nach Schnitger und Gross gestoppt. Im unteren therapeutischen Bereich von 0,01 - 0,09 U/ml waren von 28 Fällen 9 (32 %) im Normalbereich trotz Heparinisierung. Das heißt, die Thrombinzeit zeigt bei einer Verdünnung der Stammlösung von 80 NIH (s. S. 20 Material u. Methoden) auf 2,5 NIH-Einheiten in diesem Bereich zu 68 % eine Heparinempfindlichkeit.

Tab. 10 Heparin-Thrombinzeit-Beziehung
Mittelwerte und Standardabweichungen der Thrombinzeit
bei ansteigenden Heparinkonzentrationen

Heparin U/ml	Zahl der TZ- Bestimmungen	TZ Log.(sec) Mittelwert	Standard- abweichung
0,00	23	3,014	0,08
0,01	1	3,996	-
0,02	1	3,296	-
0,03	1	3,045	-
0,05	9	3,189	0,16
0,06	3	3,396	0,22
0,07	4	3,395	0,24
0,08	5	3,227	0,23
0,09	4	3,230	0,15
0,10	2	3,820	-
0,12	7	3,573	0,25
0,14	5	3,620	0,18
0,16	6	3,757	0,15
0,18	3	3,829	0,25
0,20	4	3,701	0,35
0,22	1	3,784	-
0,25	4	3,695	0,54
0,28	2	4,123	-
0,32	2	4,590	-

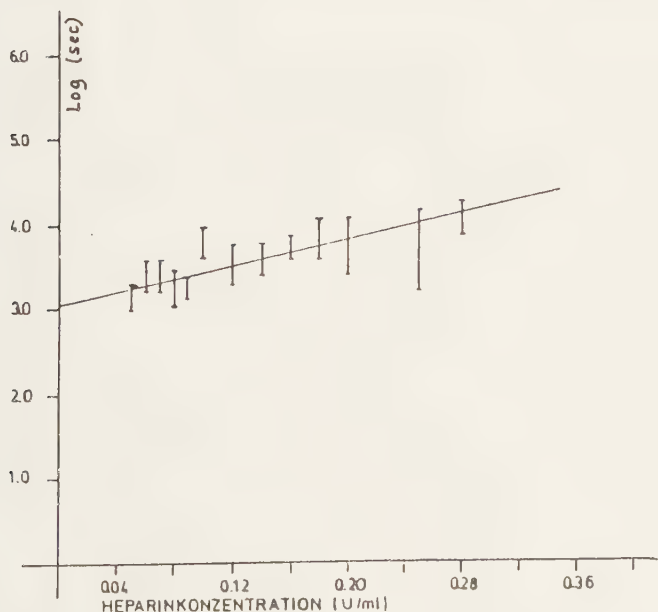


Abb. 13 Heparin-Thrombinzeit-Beziehung
Darstellung der Regressionsgeraden $y = 3,050 + 3,920 \times$
 x = Heparinkonzentration (U/ml)
 y = Thrombinzeit (Log.[sec])

5.5 Antithrombin III

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv lag der Antithrombinspiegel bei 32 % der Patienten zwischen 60 und 80 % Antithrombin III und bei 6 % unter 60 % Antithrombin III. Einen Abfall der AT-III-Spiegel unter Heparinisierung auszuwerten war nicht möglich, da bei stationären Neuaufnahmen aus organisatorischen Gründen kein Bezugswert (0-Wert) bestimmt werden konnte.

5.6 Fibrinogen

Bei 39 Patienten, die zum Teil einmalig, zum Teil über einen längeren Zeitraum heparinisiert wurden, wurden die Fibrinogenwerte bestimmt. Der Fibrinogenspiegel lag bei 33 Patienten im Normalbereich zwischen 170 und 420 mg/dl. Bei 6 Patienten lag der Fibrinogenspiegel außerhalb des Normbereichs:

- | | |
|------------------|--|
| Patient U.W.: | - Zustand nach Lungenembolie |
| | - Heparintherapie mit 1.400 E/h über 8 Tage |
| | - Fibrinogenspiegel im Mittel 450 mg/dl, fiel am 8. Tag auf 110 mg/dl ab. |
| Patient B.-H.P.: | - Zustand nach gramnegativer Sepsis mit DIC |
| | - Heparintherapie mit 15.000 E/24 h über 7 Wochen |
| | - Fibrinogenspiegel in der 1. Woche 520 mg/dl, fiel in der 6. - 7. Woche auf 130 mg/dl im Mittel ab. |
| Patient H.K.: | - Metastasierendes Schilddrüsenkarzinom |
| | - Zustand nach Hüftkopf-Prothesen-Operation |
| | - Heparintherapie mit 600 E/h |
| | - Fibrinogenspiegel 560 mg/dl |

- Patient J.R.: - Tiefe Beinvenenthrombose
 - Heparintherapie 1.200 E/h über 9 Tage
 - Fibrinogenspiegel am 1. Tag 290 mg/dl
 am 9.Tag 150 mg/dl
- Patient M.G.: - Metastasierendes Magenkarzinom, DIC
 - Heparintherapie mit 7.500 E/24 h
 - Fibrinogenspiegel 105 mg/dl
- Patient M.A.: - V. a. Beinvenenthrombose, metastasie-
 rendes Hodenteratom
 - Heparintherapie 2 x 10.000 E s.c.
 - Fibrinogenspiegel 710 mg/dl

Da bei allen Patienten vor Beginn der Heparintherapie kein Nullwert bestimmt werden konnte, ist eine Auswertung bzw. ein Rückschluß auf die Fibrinogenkonzentration unter Heparinisierung nicht möglich. Hinzu kommt, daß bei zwei Patienten aufgrund des Krankheitsbilds der disseminierten intravaskulären Koagulation (DIC) eine Hypofibrinogenämie vorliegen kann.

5.7 Haemodialyse (Tab. 11)

Die Bestimmung der Blutgerinnung (Vorwerte - keine Heparinisierung) mittels aktivierter partieller Thromboplastinzeit und Thrombinzeit zeigte bei allen Patienten Normalwerte. 10 Minuten nach Gabe von 3.000 IE Heparin war die aktivierte partielle Thromboplastinzeit stark erhöht (im Mittel zwischen 129 und 144 Sekunden). Hier wurden die höchsten Heparinspiegel beobachtet, um 0,56 U/ml. Der Heparinspiegel stieg nach 270 Minuten Dialyse bei einer kontinuierlichen Zufuhr von 1.200 IE Heparin auf 0,48 - 0,56 U/ml im Plasma. Die Patienten erhielten während der 5stündigen Dialyse 9.000 IE Heparin (3.000 IE Bolus + 1.200 IE/h).

Tab. 11 Heparin, aPTT, Thrombinzeit, Antithrombin III und Fibrinogen im Plasma vor und während Haemodialysen
(4 Patienten à 2 Dialysen, Bolus 3000 IE/h + 1200 IE/h = 9000 IE Heparin in 5 Stunden)

Pat.- Nr.	Heparin U/ml		aPTT sec		TZ sec		AT III %	Fibrinogen mg/dl			
	1.Tag	2.Tag	1.Tag	2.Tag	1.Tag	2.Tag		1.Tag	2.Tag		
	1	0,0	0,0	32	32	23	24	78	89	210	210
	2	0,0	0,0	35	35	24	24	77	77	175	250
	3	0,0	0,0	41	40	25	28	98	85	240	260
	4	0,0	0,0	33	33	27	25	103	101	195	250
Vorwerte											
Mittelwerte		0,0	0,0	35	35	25	25	89	88	205	242
	1	0,72	0,45	117	129	n.m.*	n.m.	66	83	205	220
	2	0,62	0,54	183	173	n.m.	n.m.	70	73	175	230
	3	0,39	0,80	118	196	n.m.	n.m.	88	87	200	270
	4	0,40	0,39	100	77	n.m.	n.m.	96	89	180	260
Mittelwerte		0,53	0,55	129	144	-	-	80	83	190	245
	1	0,39	0,38	68	67	n.m.	n.m.	78	90	200	230
	2	0,45	0,60	88	106	n.m.	n.m.	78	80	230	240
	3	0,38	0,80	87	200	n.m.	n.m.	92	91	240	250
	4	0,68	0,45	79	67	n.m.	n.m.	103	99	200	330
Mittelwerte		0,48	0,56	80	110	-	-	88	90	217	262
	1	0,39	0,37	78	70	n.m.	n.m.	84	99	240	240
	2	0,36	0,53	77	154	n.m.	n.m.	82	87	270	260
	3	0,37	0,74	72	175	n.m.	n.m.	98	105	240	230
	4	0,85	0,51	191	135	n.m.	n.m.	122	98	240	340
Mittelwerte		0,49	0,51	104	137	-	-	96	97	247	267
	1	0,36	0,40	175	89	n.m.	n.m.	74	85	200	210
	2	0,45	0,50	168	176	n.m.	n.m.	75	80	170	170
	3	0,60	0,60	186	135	n.m.	n.m.	83	95	260	250
	4	0,65	0,35	179	161	n.m.	n.m.	103	88	200	260
Mittelwerte		0,52	0,46	177	140	-	-	84	84	208	223

* = nicht meßbar

Während die Thrombinzeit entsprechend unserer Messungen ab einer Heparinkonzentration von 0,30 U/ml nicht mehr meßbar war, war die aktivierte partielle Thromboplastinzeit auf das 3- bis 4fache verlängert und bestätigte damit die ausreichende Heparinisierung.

Der AT-III-Spiegel lag zu Beginn der Dialyse bei allen Patienten mit durchschnittlich 88 - 89 % im Normbereich und fiel nach Gabe des Bolus im Mittel um 6 % ab. Nach 30 Minuten hatte er seinen Ausgangswert wieder erreicht und stieg dann nach 2 1/2 Stunden Dialyse auf 96 - 97 % an. Nach 5 Stunden Dialyse lag er bei 84 %.

Der Fibrinogengehalt blieb mit 231 mg/dl $\pm$ 10 mg/dl konstant (Dialysegerät: Cobe-Centry^R 2000, Cobe Lakewood, USA).

5.8 Extrakorporaler Kreislauf

(Abb. 14, 15, Tab. 12, 13)

Die vor Beginn des extrakorporalen Kreislaufs gemessenen Werte für die aktivierte partielle Thromboplastinzeit, die Thrombinzeit und das Antithrombin III lagen im Normbereich. 10 Minuten nach Heparinisierung waren die aktivierte partielle Thromboplastinzeit und die Thrombinzeit nicht mehr meßbar. Die Werte für Antithrombin III lagen unwesentlich unter den Ausgangswerten. Die gemessenen Heparin-Konzentrationen erreichten Werte zwischen 4,6 und 8,0 U/ml mit einem Mittelwert von 6,9 U/ml.

Wegen der hohen Heparinkonzentrationen mußte das Plasma der Patienten bis zu 1 : 21 mit Normalplasma verdünnt werden.

60 Minuten nach Zufuhr einer der gegebenen Heparindosis adäquaten Protamin-Dosis sind die Werte für die aktivierte partielle Thromboplastinzeit fast alle im Normbereich, die Thrombinzeit ist noch geringfügig erhöht. Heparin läßt sich nicht mehr oder nur in kleinsten Kon-

zentrationen nachweisen. Auch 30 bzw. 120 Minuten nach Protamin-Gabe ist kein wesentlicher Heparin-Spiegel mehr meßbar.

Einen deutlichen Abfall zeigen die Werte für das Antithrombin III. Die niedrigsten Werte finden sich hier im Verlauf des Eingriffs. Nach Beendigung des extrakorporalen Kreislaufs steigen sie wieder in den Normbereich an.

Das Fibrinogen fiel von 264,5 mg/dl bei Beginn der Operation nach 60 Minuten Operationsdauer auf 125 mg/dl ab. 120 Minuten nach Protamin-Gabe war der Spiegel wieder auf 221 mg/dl gestiegen (Abb. 14).

(Herz-Lungen-Maschine: Stöckert GmbH, München)

Tab. 12 Charakteristika der untersuchten Patienten

Pat.	Alter	Krankheit	Therapie
F.K.	55	koronare Herzkrankheit 1-Gefäßerkrankung	aorto-koronarer Bypass
S.A.	48	koronare Herzkrankheit 3-Gefäßerkrankung	aorto-koronarer Bypass
O.E.	42	Aorteninsuffizienz Mitralinsuffizienz	Doppelklappenersatz
G.G.	60	komb. Mitralvitium	Mitralklappenersatz
S.R.	53	koronare Herzkrankheit 3-Gefäßerkrankung	aorto-koronarer Bypass
H.R.	50	koronare Herzkrankheit 3-Gefäßerkrankung	aorto-koronarer Bypass
S.J.	59	koronare Herzkrankheit 1-Gefäßerkrankung	aorto-koronarer Bypass
N.T.	60	koronare Herzkrankheit 3-Gefäßerkrankung	aorto-koronarer Bypass
H.J.	52	komb. Aortenvitium	Aortenklappenersatz
K.L.	49	koronare Herzkrankheit 3-Gefäßerkrankung	aorto-koronarer Bypass

Tab. 13 Heparin, aPTT und AT III im Plasma vor und während der Herzoperation

Vorwerte			
Pat.	aPTT sec	TZ sec	AT III %
F.K.	39	22	64
S.A.	43	22	65
O.E.	41	22	79
G.G.	35	22	84
S.R.	36	21	65
H.R.	46	20	89
S.J.	30	20	57
N.T.	36	23	86
H.J.	38	23	76
K.L.	54	21	59

10 Min. nach Heparin-Injektion			
Pat.	aPTT TZ	AT III %	Heparin U/ml
F.K.	n.m.*	69	8,0
S.A.	n.m.	52	7,8
O.E.	n.m.	71	8,0
G.G.	n.m.	77	7,4
S.R.	n.m.	65	5,9
H.R.	n.m.	76	5,7
S.J.	n.m.	61	7,4
N.T.	n.m.	83	7,6
H.J.	n.m.	75	4,6
K.L.	n.m.	31	6,7

60 Min. nach Heparin-Injektion			
Pat.	aPTT TZ	AT III %	Heparin U/ml
F.K.	n.m.	39	5,0
S.A.	n.m.	37	4,7
O.E.	n.m.	24	5,9
G.G.	n.m.	35	3,4
S.R.	n.m.	35	2,5
H.R.	n.m.	49	3,8
S.J.	n.m.	28	4,0
N.T.	n.m.	32	4,4
H.J.	n.m.	34	3,6
K.L.	n.m.	27	6,7

* nicht meßbar

Tab. 13a Heparin, aPTT und AT III im Plasma nach Protamin-Gabe

10 Min. nach Protamin-Gabe				
Pat.	aPTT sec	TZ sec	AT III %	Heparin U/ml
F.K.	36	25	44	0,0
S.A.	43	27	43	0,1
O.E.	57	27	47	0,0
G.G.	38	23	54	0,0
S.R.	42	26	43	0,01
H.R.	40	23	63	0,07
S.J.	35	26	32	0,08
N.T.	38	25	50	0,0
H.J.	38	29	52	0,01
K.L.	50	27	49	0,03

30 Min. nach Protamin-Gabe				
Pat.	aPTT sec	TZ sec	AT III %	Heparin U/ml
F.K.	36	27	69	0,0
S.A.	43	28	58	0,05
O.E.	51	27	71	0,0
G.G.	35	24	77	0,05
S.R.	42	29	62	0,06
H.R.	41	24	69	0,07
S.J.	36	22	51	0,0
N.T.	36	26	60	0,05
H.J.	43	30	52	0,06
K.L.	34	24	69	0,08

120 Min. nach Protamin-Gabe				
Pat.	aPTT sec	TZ sec	AT III %	Heparin U/ml
F.K.	35	26	71	0,0
S.A.	42	26	59	0,06
O.E.	41	26	71	0,05
G.G.	36	23	87	0,07
S.R.	39	23	69	0,05
H.R.	35	21	70	0,09
S.J.	32	23	60	0,07
N.T.	33	25	78	0,07
H.J.	41	26	72	0,07
K.L.	41	22	75	0,09

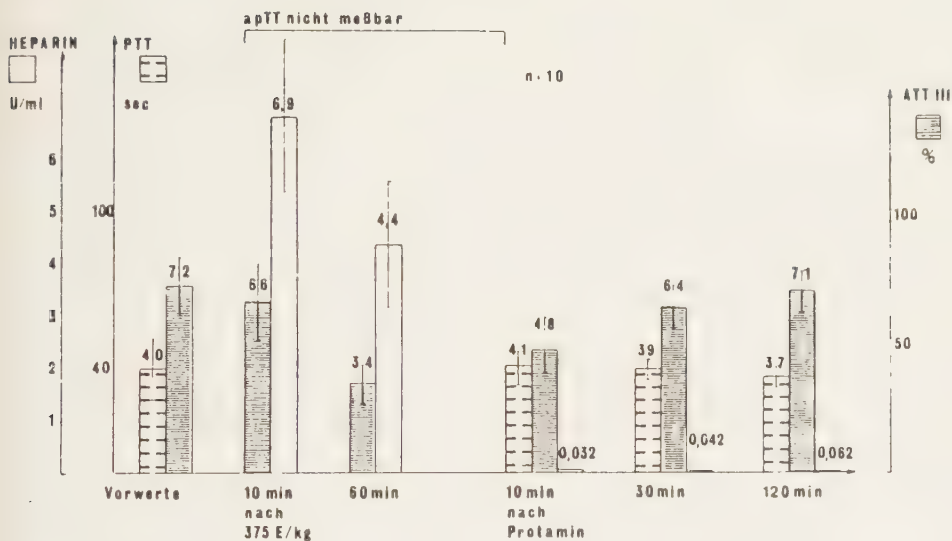


Abb. 14 aPTT, AT III und Heparin im Plasma bei Herzoperationen

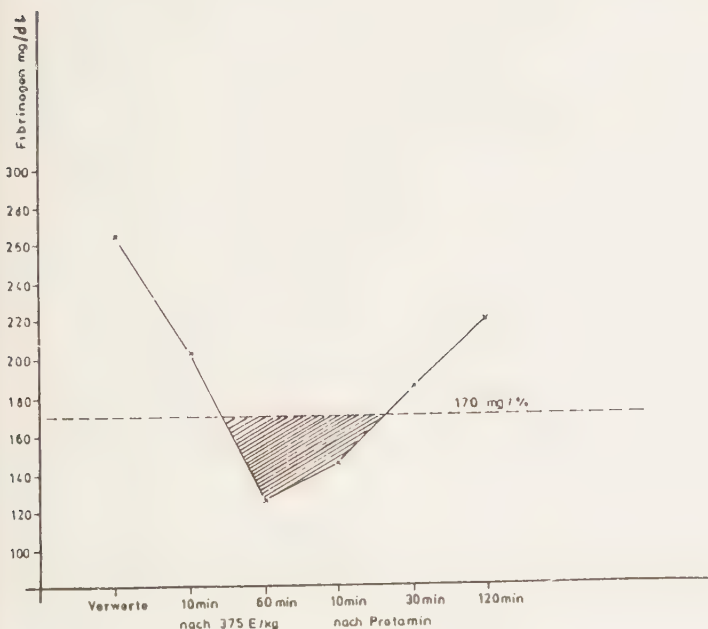


Abb. 15 Fibrinogenkonzentration im Plasma bei Herzoperationen

5.9 Kosten der Heparin- und Antithrombin-III-Bestimmung

Die Kosten für 50 Antithrombin-III-Bestimmungen (1 AT-III-Reagenziensatz) betrugen 357,-- DM und für 100 Heparinbestimmungen (1 Heparin-Reagenziensatz) 571,20 DM. Um die Heparin-Bezugskurve für ein kommerzielles Heparin zu erstellen, sind etwa 40 Messungen notwendig, d. h., eine Heparin-Bezugskurve kostet $5,712 \text{ DM} \times 40 = 228,48 \text{ DM}$. Da wir 10 Bezugskurven erstellten (für jedes der 5 Heparine 2 Kurven), beliefen sich die Kosten auf 2.284,80 DM plus 5,71 DM pro Heparinbestimmung und Patient.

Um das Gerät bei der AT-III-Bestimmung auf einen Bezugswert zu eichen, wurden täglich 5 Bestimmungen durchgeführt, entsprechend 35,70 DM.

Wenn man von der Annahme ausgeht, daß bei 10 Patienten jeden Tag der Antithrombin-III-Spiegel gemessen wird, belaufen sich die Kosten (Doppelbestimmungen vorausgesetzt) auf $20 \times 7,14 \text{ DM} = 142,80 \text{ DM} + 35,70 \text{ DM} = 178,50 : 10$ (Patienten) eine AT III Bestimmung kostet somit 17,85 DM.

Die hier aufgeführten Kosten betreffen nur das Material.

6. DISKUSSION

Heparin greift an den verschiedenen strategisch wichtigen Punkten hemmend in den Gerinnungsablauf ein, so daß nicht von Heparinaktivität, sondern eher von Heparinaktivitäten gesprochen werden sollte. Von den verschiedenen Heparinwirkungen scheint der beschleunigende Effekt auf die Inaktivierung von Thrombin und Faktor Xa durch Antithrombin III die größte praktische und klinische Konsequenz zu besitzen (8, 71, 36).

Ist Antithrombin III im Überschuß verfügbar, so wird die Größe der Inaktivierung durch die Heparinkonzentration bestimmt (87). Damit ist der Therapieeffekt im Gerinnungssystem abhängig von Antithrombin III, dessen Wirkung durch Heparin verstärkt wird.

Die Kontrolle der Heparintherapie ist eingeschränkt durch die Unzulänglichkeit der zur Anwendung kommenden Überwachungsmethoden (63).

Die drei verschiedenen hier miteinander verglichenen Kontrollmethoden messen unterschiedliche Wirkungen des Heparins und sind daher nur bedingt miteinander vergleichbar, besonders auch deshalb, weil sie ganz unterschiedlichen Störeinflüssen und Fehlerquellen unterliegen. So verändert bei der Thrombinzeit ein Abfall der Fibrinogenkonzentration unter 80 mg/dl das Ergebnis, ebenso die Anwesenheit von Fibrinogenspaltprodukten (48, 85). Andererseits registriert die Thrombinzeit eine für den therapeutischen Effekt wichtige Verminderung von Antithrombin III (8).

Die Thrombinzeit gibt bei den von uns ermittelten Werten zwischen 0,05 und 0,3 U/ml nur über einen relativ gerin-

gen Bereich eine lineare Beziehung zur Heparinkonzentration. Die Gerinnungszeiten der Thrombinzeit stellen keine absolute Größe dar, sondern sind von der Stärke verwendeten Thrombinlösung, der Art des verwendeten Thrombins und der Technik der Gerinnungsbestimmung abhängig (48).

Über die Messung niedriger Heparinspiegel mit verdünnter Thrombinlösung im Testansatz wurde berichtet (87, 88).

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) ist heute mehr und mehr als Gerinnungstest der Wahl zur Heparinüberwachung angegeben (24, 31). Die aPTT registriert als einzige der hier untersuchten Methoden empfindlich die Heparinwirkung auf die Faktoren VIII, X, XI, XII und deren Konstanz. Außerdem ist sie weniger empfindlich bei Verminderung der Faktoren I, II (66).

Wir konnten eine Heparinempfindlichkeit ab 0,13 Einheiten Heparin pro ml Plasma feststellen. Der Nachweis gelang bis zur Konzentration im Bereich von 0,9 Einheiten pro ml Plasma. Den Vorteilen einerseits - über einen großen Bereich eine lineare Beziehung zwischen Heparinkonzentration und Gerinnungszeit sowie globale Registrierung der Heparinwirkung auf das Gerinnungssystem steht andererseits die relative Unempfindlichkeit dieser Methode gegenüber, sobald eine Messung mit niedriger Heparinkonzentration zwischen 0,01 und 0,12 Einheiten pro ml Plasma durchgeführt werden muß.

Die Bestimmung der Restthrombinaktivität unter Heparintherapie und bei AT-III-Überschuß, gemessen mit einem fluorigenen Substrat (AIE), ist vom Einfluß der meisten Einzelfaktoren unabhängig.

Bei den von uns überprüften 5 verschiedenen Heparinpräparaten kann ein Heparinnachweis schon bei einer Konzentration von 0,01 U/ml erbracht werden. Somit ist die Methode

6. DISKUSSION

Heparin greift an den verschiedenen strategisch wichtigen Punkten hemmend in den Gerinnungsablauf ein, so daß nicht von Heparinaktivität, sondern eher von Heparinaktivitäten gesprochen werden sollte. Von den verschiedenen Heparinwirkungen scheint der beschleunigende Effekt auf die Inaktivierung von Thrombin und Faktor Xa durch Antithrombin III die größte praktische und klinische Konsequenz zu besitzen (8, 71, 36).

Ist Antithrombin III im Überschuß verfügbar, so wird die Größe der Inaktivierung durch die Heparinkonzentration bestimmt (87). Damit ist der Therapieeffekt im Gerinnungssystem abhängig von Antithrombin III, dessen Wirkung durch Heparin verstärkt wird.

Die Kontrolle der Heparintherapie ist eingeschränkt durch die Unzulänglichkeit der zur Anwendung kommenden Überwachungsmethoden (63).

Die drei verschiedenen hier miteinander verglichenen Kontrollmethoden messen unterschiedliche Wirkungen des Heparins und sind daher nur bedingt miteinander vergleichbar, besonders auch deshalb, weil sie ganz unterschiedlichen Störeinflüssen und Fehlerquellen unterliegen. So verändert bei der Thrombinzeit ein Abfall der Fibrinogenkonzentration unter 80 mg/dl das Ergebnis, ebenso die Anwesenheit von Fibrinogenspaltprodukten (48, 85). Andererseits registriert die Thrombinzeit eine für den therapeutischen Effekt wichtige Verminderung von Antithrombin III (8).

Die Thrombinzeit gibt bei den von uns ermittelten Werten zwischen 0,05 und 0,3 U/ml nur über einen relativ gerin-

gen Bereich eine lineare Beziehung zur Heparinkonzentration. Die Gerinnungszeiten der Thrombinzeit stellen keine absolute Größe dar, sondern sind von der Stärke der verwendeten Thrombinlösung, der Art des verwendeten Thrombins und der Technik der Gerinnungsbestimmung abhängig (48).

Über die Messung niedriger Heparinspiegel mit verdünnter Thrombinlösung im Testansatz wurde berichtet (87, 8).

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) wird heute mehr und mehr als Gerinnungstest der Wahl zur Heparinüberwachung angegeben (24, 31). Die aPTT registriert als einzige der hier untersuchten Methoden empfindlich die Heparinwirkung auf die Faktoren VIII, IX, X, XI, XII und deren Konstanz. Außerdem ist sie verlängert bei Verminderung der Faktoren I, II (66).

Wir konnten eine Heparinempfindlichkeit ab 0,13 Einheiten Heparin pro ml Plasma feststellen. Der Nachweis gelang bis zur Konzentration im Bereich von 0,9 Einheiten pro ml Plasma. Den Vorteilen einerseits - über einen großen Bereich eine lineare Beziehung zwischen Heparinkonzentration und Gerinnungszeit sowie globale Registrierung der Heparinwirkung auf das Gerinnungssystem - steht andererseits die relative Unempfindlichkeit dieser Methode gegenüber, sobald eine Messung mit niedriger Heparinkonzentration zwischen 0,01 und 0,12 Einheiten pro ml Plasma durchgeführt werden muß.

Die Bestimmung der Restthrombinaktivität unter Heparintherapie und bei AT-III-Überschuß, gemessen mit einem fluorigenen Substrat (AIE), ist vom Einfluß der meisten Einzelfaktoren unabhängig.

Bei den von uns überprüften 5 verschiedenen Heparinen kann ein Heparinnachweis schon bei einer Konzentration von 0,01 U/ml erbracht werden. Somit ist die Methode

ausreichend sensibel, um Konzentrationen von Heparin im Plasma zu erfassen, die bei einer niedrig dosierten Therapie zu erwarten sind. Ohne Verdünnung des Patientenplasmas mit Normalplasmapool war ein Nachweis von Heparin bis zu 0,9 U/ml Plasma möglich.

Von 52 Patienten unter Heparintherapie war bei 96 % der Heparinspiegel meßbar. Bei den 2 Patienten, bei denen der Heparinnachweis mit der fluorometrischen Methode nicht gelang, ist es vorstellbar, daß sie trotz Anordnung überhaupt kein Heparin erhielten.

Die im Rahmen von 10 Operationen am extrakorporalen Kreislauf verwendete Methode der fluorometrischen Heparinbestimmung im Plasma erlaubt die rasche Orientierung über die Antikoagulation und die Festlegung der zur Neutralisation erforderlichen Protamin-Dosis am Ende des Eingriffs.

Erwartungsgemäß waren während der gesamten Operationsdauer und der damit notwendigen Heparinisierung Thrombinzeit und aktivierte partielle Thromboplastinzeit nicht meßbar. Die wenige Minuten nach Bolusinjektion der Initialdosis Heparin gemessenen Heparinkonzentrationen zeigen exzessiv hohe Werte, die maximal 8,0 U/ml erreichten (Abb. 14).

Bemerkenswert ist der kontinuierliche und ausgeprägte Abfall des AT III und des Fibrinogens während der Operation, am besten erklärbar durch die Kombination von Verlust, Verdünnung und Verbrauch. Angesichts dieses Befundes erscheint die hohe Heparinkonzentration von Vorteil, um Thrombosierungen im extrakorporalen Kreislauf und beim Patienten vermeiden zu können (Abb. 14, 15).

Die am Ende des extrakorporalen Kreislaufs gegebene Protamin-Dosis zur Neutralisierung des Heparins war bei allen unserer Patienten ausreichend. Heparin war in 4 Fäl-

len nicht mehr, in den übrigen nur mehr in geringsten Konzentrationen nachweisbar. Diese Werte, die ausnahmslos unter 0,1 U/ml liegen, werden nach eigenen Untersuchungen bei "Low dose Heparin-Therapien" erreicht. Parallel dazu sind Thrombinzeit und aktivierte partielle Thromboplastinzeit wieder nahezu im Normbereich bzw. geringfügig erhöht. Diskrepanzen zwischen nicht mehr meßbaren Heparinkonzentrationen und deutlich erhöhten Werten für die aktivierte partielle Thromboplastinzeit, wie sie von Späthe (78) beobachtet wurden, und die auf eine Überdosierung von Protamin hinweisen, wurden von uns nicht festgestellt.

Es ist bekannt, daß Protamin die Thrombinaktivität sowohl über die Freisetzung von Antithrombin III aus dem Heparin-AT-III-Komplex beeinflusst als auch durch einen eigenen hemmenden Effekt auf Thrombin (86). Diese Hemmung ist dosisabhängig und reversibel. Darüberhinaus beeinflusst überschüssiges Protamin die Plättchenfunktion (16, 61).

So ist die Heparinspiegel-Bestimmung vor Protamin-Neutralisation eine Möglichkeit, die erforderliche Protamin-Dosis exakt zu berechnen und Nachblutungen aufgrund einer Protamin-Überdosierung zu vermeiden.

Die Untersuchungsergebnisse an Haemodialyse-Patienten ergaben deutlich niedrigere Heparinkonzentrationen als bei herzchirurgischen Patienten am extrakorporalen Kreislauf. Mit der von uns beschriebenen Heparin-Dosierung ist die aktivierte partielle Thromboplastinzeit ausreichend empfindlich, um bei Hämodialysen die Gerinnung zu kontrollieren. Wie die Erfahrung zeigt, reicht die gewählte Heparinkonzentration aus, um eine Verstopfung der Membranen des Dialysegeräts durch Thromben zu verhindern.

Unsere Untersuchungen lassen die Schlußfolgerung zu, daß eine generelle Überwachung der Patienten unter niedrig dosierter Heparintherapie nicht sinnvoll ist, während die Notwendigkeit der Laborüberwachung einer Therapie, die über eine "Low Dose-Behandlung" hinausgeht, allgemein anerkannt ist (31). Bei keinem der von uns kontrollierten 17 Patienten mit einer Therapie von unter 15.000 E Heparin/24 h war die aktivierte partielle Thromboplastinzeit exzessiv erhöht oder gar nicht meßbar.

In der Regel kann die Heparin-Dosierung bei der Therapie von Venenthrombosen und Lungenembolien durch funktionelle Gerinnungstests überwacht werden. Eine sehr einfache, im niederen bis mittleren Bereich ausreichend genaue Methode ist die Thrombinzeit unter Verwendung einer niedrig konzentrierten Thrombinlösung (2,5 NIH-Einheiten/ml). Die partielle Thrombinzeit erfaßt höhere Heparinkonzentrationen präziser als niedrige Heparinkonzentrationen im Blut. Auf die gute Korrelation zwischen Heparin und Thrombinzeit einerseits und Heparin und aktivierter partieller Thromboplastinzeit andererseits wurde schon hingewiesen (5).

Die zeitlich, personell und technisch aufwendigere und auch weit kostenintensivere Bestimmung von Antithrombin III und Heparin sollte Problemfällen und solchen Eingriffen, die hohe Heparin-Dosen erfordern, vorbehalten bleiben. Die Bestimmung empfiehlt sich für die Fälle, bei denen anamnestisch ein erhöhtes thromboembolisches Risiko bekannt oder zu erwarten ist. Da bei erniedrigten Antithrombin-III-Spiegeln eine erhöhte Heparintoleranz besteht, sind hier die Spiegelbestimmungen angezeigt (45, 83). Bei den sehr hohen Heparin-Dosen, die während des extrakorporalen Kreislaufs gegeben werden müssen, ist die Bestimmung des Endpunkts der Gerinnung von

Thrombinzeit und aktivierter partieller Thromboplastinzeit oft nicht möglich. Zur Orientierung über die Höhe des Plasma-Heparinspiegels ist der Einsatz der synthetischen Substrate sehr vorteilhaft. Nach Beendigung des extrakorporalen Kreislaufs kann die zur Neutralisation von Heparin erforderliche Menge von Protaminchlorid exakt berechnet werden. Eine wichtige Forderung bei der Heparinspiegel-Bestimmung ist die Erstellung der Eichkurve immer mit demselben Heparinpräparat, das auch der Patient erhält.

7. ZUSAMMENFASSUNG

52 Patienten, die bei unterschiedlichen Grunderkrankungen unter einer Heparintherapie standen, wurden mehrfach Blutproben entnommen, um die Konzentration des Heparins und des Antithrombin III im Plasma mit Hilfe eines synthetischen fluorogenen Substrats zu messen. Die Bestimmung von Heparin und AT III erfolgte durch kinetische Messung der Restthrombinaktivität im Plasma mittels eines fluoreszierenden Moleküls, das bei der Reaktion mit Thrombin gespalten wird. Anhand der mit einem Normalplasmapool erstellten Heparin-Bezugskurven (= Standardkurven) kann die Heparinkonzentration des Patientenplasmas direkt abgelesen werden. Die Antithrombin-III-Spiegel wurden über Umrechnung mit Normalplasmapool ermittelt. Da fünf verschiedene kommerziell erhältliche Heparine verabreicht wurden, mußte für jedes Heparin eine entsprechende Bezugskurve erstellt werden. Zusätzlich wurden als herkömmliche Gerinnungsparameter die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), die Thrombinzeit (TZ) und der Fibrinogenspiegel gemessen.

Zweck der Untersuchung war es festzustellen, ob die drei Methoden der Heparinbestimmung, d. h. die Messung der Heparinkonzentration im Plasma, die aPTT und die TZ miteinander vergleichbar sind und welcher Stellenwert ihnen in der klinischen Routinediagnostik zuzuordnen ist. Diese drei Parameter wurden einer linearen Regressionsanalyse unterworfen.

- Die Heparinkonzentration im Plasma zeigte eine gute Korrelation zur aPTT und TZ.
- Mit dem fluorogenen Substrat können ohne Verdünnung Konzentrationen von Heparin bis 0,9 U/ml ermittelt

und im niederen therapeutischen Bereich Konzentrationen ab einer Differenz von 0,01 U/ml sicher unterschieden werden. Die hier verwendete photometrische Methode mit fluorogenem Substrat ist ein empfindlicher Test zur Bestimmung der Heparinkonzentrationen. Allerdings ist diese Methode im Vergleich zu den beiden anderen sehr kostenintensiv.

- Die Thrombinzeit zeigte zwar eine Veränderung von Antithrombin III an, jedoch nicht Störungen der frühen Phase der Gerinnungsaktivierung. Nur im Bereich zwischen 0,05 und 0,3 Einheiten Heparin/ml Plasma kann ein Gerinnungsendpunkt bestimmt werden.
- Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit hat vor allem den Vorteil, daß sie Konzentrationsschwankungen der Faktoren I, II, VIII, IX, X, XI und XII wie auch eine mögliche Heparineinwirkung auf dieselben registriert und Heparinkonzentrationen bis 0,9 U/ml erfaßt. Sie ist allerdings im niederen Konzentrationsbereich nicht sehr empfindlich. Erst ab 0,13 Einheiten Heparin/ml Plasma kommt es zur statistisch sicheren Gerinnungszeitverlängerung.

Wichtige Indikationen für eine Heparinspiegelbestimmung sind bestimmte Problemfälle wie volle therapeutische Heparindosen, die zu keinen entsprechenden Veränderungen der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit führen, oder die Verabreichung bei sehr hohen Heparinkonzentrationen (z. B. extrakorporaler Kreislauf), bei denen erfahrungsgemäß mit den funktionellen Tests kein Endpunkt der Gerinnung erreicht werden kann.

Der behandelnde Arzt sollte sich entsprechend der Grundkrankheit des Patienten und der klinischen Situation darüber im klaren sein, ob eine genaue Heparinspiegelbestimmung unerlässlich ist oder ob die Information über die Wirkung des zugeführten Heparins auf das Gerinnungssystem ausreichend ist.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ANDERSSON, L. O. et al.:
Anticoagulant properties of heparin fractionated
by affinity chromatography on matrixbound anti-
thrombin III and by gel filtration. Thrombos. Res.
9: 575-583 (1976)
- 2 BARRITT, D. W., S. C. JORDAN:
Anticoagulant drugs in the treatment of pulmonary
embolism: A control trial. Lancet.
1: 1309 - 1312 (1960)
- 3 BARTL, K., E. DORSCH, H. LILL, J. ZIEGENHORN:
Determination of the biological activity of heparin
by use of a chromogenic substrate.
Thrombos. Haemostas.
42: 1446 - 1451 (1979)
- 4 BEST, C. H., L. B. JAKES:
Heparin in blood clotting and thrombosis.
Ann. N. Y. Acad. Sci.
49: 501 - 517 (1948)
- 5 BOURNAMEAUX, H., G. A. MARBET et al.:
Comparison of thrombin time, activated partial
thromboplastin time, and plasma heparin concen-
tration, and analysis of behavior of AT III.
Amer. J. Clin. Pathol.
74: 68 - 73 (1980)
- 6 BRUHN, H. D.:
Heparin-Antikoagulation beim akuten Myokardinfarkt.
Dtsch. Med. Wschr.
105: 1239 - 1240 (1980)
- 7 BRUHN, H. D.:
Niedrig dosiertes Heparin: Wirkungsweise und Indi-
kationen.
2. Aufl. Stuttgart; New York: Schattauer (1980)
- 8 BRUHN, H. D., J. P. ALBERT, L. SACHS, H. TIMME:
Qualitätsvergleich verschiedener Kontrollmethoden
bei der Überwachung der Prophylaxe mit niedrig do-
siertem Heparin. Lab. Med.
4: 153 - 156 (1980)

- 9 CHAN, T. K., V. Chan:
Antithrombin III, the major modulator of intra-vascular coagulation, is synthesized by human endothelial cells. *Thrombos. Haemostas.*
46: 504 - 506 (1981)

- 10 CHARGRAFF, G., K. B. OLSON:
Studies on the chemistry of blood coagulation. *J. Biol. Chem.*
122: 153 - 167 (1977)

- 11 CIFONELLI, J. A., J. KING:
Structural studies on heparin with unusually high N-acetylglucosamine contents. *Biochem. Biophys. Acta.*
320: 331 - 340 (1973)

- 12 CLAUSS, A.:
Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta. Haemat.*
17: 237 - 246 (1957)

- 13 DANISHEFSKY, J., H. STEINET, A. BELLA, A. FRIEDLANDER:
Investigations on the chemistry of heparinposition of the sulphate ester groups. *J. Biol. Chem.*
244: 1741 - 1745 (1969)

- 14 DIETRICH, C. P.:
Novel heparin degradation products: Isolation and characterization of novel disaccharides and oligosaccharides produced from heparin by bacterial degradation. *Biochem. J.*
108: 647 - 654 (1968)

- 15 EGEBERG, O.:
Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Thrombos. Diathes. haemorrh.*
13: 516 - 530 (1965)

- 16 ELLISON, N., L. H. jr. EDMUNDS, R. W. COLMAN:
Platelet aggregation following heparin and protamin administration. *Anesth.*
48: 65 - 68 (1978)

- 17 ESTES, J., P. POULIN:
Pharmacokinetics of heparin. *Thrombos. Diathes. haemorrh.*
33: 26 - 37 (1975)

- 18 ESTES, J. W., E. W. PELIKAN, E. KRÜBER-THIEMER:
A retrospective survey of the pharmacodynamics of heparin. *Clin. Pharm. Ther.*
10: 329 - 337 (1969)

- 19 FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL:
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxi-
kologie. 3. Aufl. Mannheim; Wien; Zürich: Biblio-
graphisches Institut
253 - 256 (1980)
- 20 FRATANTONI, J. C., R. POLLET, H. R. GRALNICK:
Heparin induced thrombocytopenia: Confirmation of
diagnosis with in vitro methods. Blood.
45: 395 - 401 (1962)
- 21 GASTPAR, H.:
Physiologische Bedeutung und pharmakologische Wir-
kung des Heparins. Suppl. XVI zu Thrombos. Diathes.
Haemorrh. Stuttgart; New Vork: Schattauer (1965)
- 22 GASTPAR, H., N. GOOSENS:
Untersuchungen über die Dosisabhängigkeit der aus-
geschiedenen Heparinmengen im Urin des Menschen.
Proc. 8th Congr., Europ. Soc. Haematol., Wien,
1961. Basel: Karger, Bd. 2 (1962)
- 23 GIANNITSIS, D. J.:
Neutralising effect of histone fractions from
human leukocyte nuclei on heparin. Arzneim.-Forsch.
Drug. Res.
28: 2158 - 2159 (1978)
- 24 GODAL, H. C.:
Heparin assay methods for control of in vivo hepa-
rin effects. Thrombos. Haemostas.
33: 77 - 80 (1975)
- 25 GOLLUB, S., A. W. ULIN:
Heparin induced thrombocytopenia in man. J. Lab.
Clin. Med.
59: 430 - 435 (1962)
- 26 GRANN, V. R., K. HOMEWOOD, W. GOLDEN:
Polybrene neutralization as a rapid means of moni-
toring plasma heparin levels. Amer. J. Clin.Pathol.
58: 26 - 32 (1972)
- 27 GRIFFITH, G. C., G. NICHOLAS, J. D. ASHER,
B. FLANAGAN:
Heparinosteoporosis. JAMA.
193: 91 - 94 (1965)
- 28 HANDIN, R. I.:
Purification and properties of platelet factor 4.
Fed. Proc.
36: 50 (1977)

- 29 HARENBERG, J.:
Neue Entwicklung auf dem Gebiet des Heparins.
Inn. Med.
10: 233 - 237 (1983)
- 30 HIEBERT, L. M., L. B. JAKES:
Heparin uptake on endothelium. Artery.
2: 26 - 37 (1976)
- 31 HILLER, E.:
Überwachung der Heparintherapie bei thromboembolischen Erkrankungen. Dtsch. Med. Wschr.
98: 1367 - 1370 (1973)
- 32 HILLER, E. P. OSTENDORF:
Heparin in Klinik und Praxis. Anästh. Prax.
12: 105 - 109 (1976)
- 33 HIRSCH, J., J. F. CADE, E. F. O'SULLIVAN:
Clinical experience with anticoagulant therapy during pregnancy. Br. Med. J.
1: 270 - 273 (1970)
- 34 HIRSCH, J., J. F. CADE, A. S. GALLUS:
Anticoagulants in pregnancy, a review of indications and complications. Amer. Heart J.
83: 301 - 305 (1972)
- 35 HJORT, P. F., C. F. BORCHGREVINK, O. H. IVERSEN
H. STORMORKEN:
The effect of heparin on the bleeding time.
Thrombos. Diathes. haemorrh.
4: 389 - 399 (1960)
- 36 HOFFMANN, A., F. MARKWARDT:
Pharmakologie des Heparins. Z. Ges. inn. Med.
34: 3 - 8 (1979)
- 37 HOWELL, W. H., E. HOLT:
Two new factors in blood coagulation - heparin and pro-antithrombin. Amer. J. Physiol.
47: 328 - 341 (1918)
- 38 INTERNATIONALES HEPARIN-SYMPOSIUM
Der praktische Arzt
25: 3406 - 3413 (1979)
- 39 JAKES, L. B.:
Heparin: An old drug with a new paradigm. Science.
206: 528 - 533 (1979)
- 40 JAKES, L. B.:
The heparins of various mammalian species and their relative anticoagulant potency. Science.
92: 488 - 489 (1940)

- 41 JAKUES, L. B., C. M. JAKUES:
The disappearance of heparin activity with liver
globulins and determination of heparinase.
Thrombos. Diathes. haemorrh., Stuttgart.
10: 71 - 80 (1963)
- 42 JAKUES, L. B.:
What ist heparin? Adv. Exp. Med. Biol.
In: International Symposium on Heparin, St. Louis,
1974: Heparin. Eds. : Ralph A. Bradshaw and Stan-
ford Wessler, New York, 1975.
52: 139 - 147 (1975)
- 43 JOHNSON, E. A., T. B. C. KIRKWOOD, Y. STIRLING
et al.:
Four heparin preparations: Anti Xa potentiating
effect of heparin after subcutaneous injection.
Thrombos. Haemostas.
35: 586 - 591 (1976)
- 44 JORPES, J. E.:
The chemistry of heparin. Biochem. J.
29: 1817 - 1830 (1935)
- 45 KAKKAR:
Diagnostica Dialog. Boehringer Mannheim
1 (1981)
- 46 KISS, J.:
Chemistry of heparin. Thrombos. Diathes. haemorrh.
33: 20 - 25 (1974)
- 47 KUSCHINSKY, G., H. LÜLLMANN:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.
8. Aufl. Stuttgart: Thieme
132 - 134 (1978)
- 48 LECHNER, K.:
Blutgerinnungsstörungen. In: Laboratoriumsdiagnose
hämatologischer Erkrankungen 2. Berlin; Heidelberg;
New York: Springer
164 - 165 (1982)
- 49 LEE, A. K. Y., V. CHAN, T. K. CHAN:
The identification and localization of antithrom-
bin III in human tissues. Thrombos. Res.
14: 209 - 217 (1979)
- 50 LINDAHL, U., G. BACKSTROM, MALMSTRÖM, FRANSSON:
Biosynthesis of L-iduronic acid in heparin:
Epimerization of D-glucuronic acid on the polymer
level. Biochem. Biophys. Res. Commun.
46: 985 - 991 (1972)

- 51 LOW, J., J. C. BIGGS:
Comparative plasma heparin levels after subcutaneous sodium and calcium heparin. *Thrombos. Haemostas.*
40: 397 - 406 (1978)
- 52 MARBET, G. A., F. DUCKERT:
Chromogenic and fluorogenic assays. In: *Heparin-new biochemical and medical aspects*. Berlin; New York: de Gruyter
343 - 362 (1983)
- 53 MARBET, R., A. WINTERSTEIN:
Zur Kenntnis der Mucopolysaccharide, insbesondere der Heparine. Basel: Experientia.
8: 41 - 44 (1952)
- 54 MARCINIAK, E., C. H. FARLEY, P. A. DESIMONE:
Familial thrombosis due to antithrombin III deficiency. *Blood*.
43: 219 - 231 (1974)
- 55 MARDER, V. J.:
Pathophysiologie und Therapie der Disseminierten Intravasalen Coagulation. *Internist*.
14: 536 - 542 (1973)
- 56 MATTLER, L. E., N. U. BANG:
Serine protease specificity for peptide chromogenic substrates. *Thrombos. Haemostas.*
38: 776 - 792 (1977)
- 57 MCLEAN, J.:
The thromboplastic action of cephalin. *Amer. J. Physiol.*
41: 250 - 257 (1916)
- 58 MITCHELL, G. A., GARGIULO, R. J., R. M. HUSSEBY:
Assay for plasma heparin using a synthetic peptide substrate for thrombin. *Thrombos. Res.*
13: 47 - 52 (1978)
- 59 NIESSNER, J., K. LECHNER:
Ärztliche Überwachung der Heparin-Therapie. In: *Kontrolle von Antithrombotika*. Hrsg.: R. Marx und H. A. Thies, Basel: Editiones Roche
37 - 46 (1981)
- 60 O'KEEFE, A. E., F. M. RUSSO-ALESI, M. A. DOLLIVER et al.:
The inhomogeneity of heparin. *J. Amer. chem. Soc.*
71: 1517 - 1518 (1949)

- 61 O'REILLY, R. A.:
Anticoagulant, antithrombotic, and thrombolytic
drugs. In: Goodman, G. A. (Ed.): The pharmacolo-
gical basis of therapeutics. New York: Macmillan.
1352 (1980)
- 62 O'SHEA, M. J., P. T. FLUTE, G. M. PANELL:
Laboratory control of heparin therapy. J. Clin.
Pathol.
24: 542 - 546 (1971)
- 63 PENNER, J. A.:
Experience with a thrombin clotting time assay for
measuring heparin activity. Amer. J. Clin. Pathol.
61: 645 - 653 (1974)
- 64 PIPER, J.:
The fate of heparin in rabbits after intravenous
injection. Filtration and tubular secretion in the
kidneys. Acta. Pharmacol. et Toxikol. (Kbh.)
3: 373 - 384 (1947)
- 65 PORTER, J., J. JICK:
Drug-related deaths among medical inpatients.
JAMA.
237: 879 - 881 (1977)
- 66 PROCTOR, R. R., S. I. RAPAPORT:
The partial thromboplastin time. Amer. J. Clin.
Pathol.
36: 212 - 219 (1961)
- 67 RICHARDS, R. L.:
Peripheral vascular disease. London: Churchill
Livingstone.
75 (1970)
- 68 ROBERTS, B., F. E. ROSATO:
Heparin - a cause of arterial emboli. Surgery.
55: 803 - 808 (1964)
- 69 ROKA, L.:
Heparin. In: Kontrolle von Antithrombotika.
XXIII. Hamburger Symposium über Blutgerinnung.
Hrsg.: R. Marx und A. Thies, Editiones Roche.
29 - 35 (1981)
- 70 ROSENBERG, D. R.:
Actions and interactions of antithrombin and
heparin. New Engl. J. Med.
292: 146 - 151 (1975)

- 71 ROSENBERG, R. D., P. S. DAMUS:
The purification and mechanism of action of human
antithrombin-heparincofactor. J. Biol. Chem.
248: 6490 - 6505 (1973)
- 72 SALIBA, M. J., R. J. SALIBA:
Heparin in burns: Dose related and dose dependent
effects. Thrombos. Diathes. haemorrh.
33: 113 - 123 (1975)
- 73 SAS, G., G. BLASKO, D. BANHEGYI, J. JAKO, L. A.
PALOS:
Abnormal antithrombin III (Antithrombin III "Buda-
pest") as a cause of familial thrombophilia.
Thrombos. Diathes. haemorrh.
32: 105 - 115 (1974)
- 74 SEGESSER, D., U. F. GRUBER:
Vergleich der Wirksamkeit von Natriumheparinat und
Calciumheparinat zur Verhütung thromboembolischer
Komplikationen. Arzneim.-Forsch./Drug Res.
11: 2157 - 2167 (1977)
- 75 SHAPIRO, G. A., S. W. HUNTZINGER, J. E. WILSON:
Variation among commercial activated partial throm-
boplastin time reagents in response to heparin.
Amer. J. Clin. Pathol.
67: 477 - 480 (1977)
- 76 SIMON, T. L., J. P. CASTON, T. M. HYERS, L. A.
HARKER:
Heparin pharmacokinetics: Increased requirements
in pulmonary embolism. Br. J. Haematol.
39: 111 - 120 (1978)
- 77 SOLOWAY, H. B., B. M. CORNETT, J. W. GRAYSON:
Comparison of various activated partial thrombo-
plastin reagents in the laboratory control of he-
parin therapy. Amer. J. Clin. Pathol.
59: 587 - 590 (1973)
- 78 SPAETHE, R., M. NAUMANN:
Monitoring of heparin during extracorporeal circu-
lation in open heart surgery. In: Heparin: New bio-
chemical and medical aspects. Berlin; New York:
de Gruyter, Hrsg.: I. Witt (1983)
- 79 TALSTAD, J.:
A new principle in heparin assaying based on par-
tial neutralization of heparin with polybrene.
Thrombos. Res.
18: 485 - 491 (1980)

- 80 TEIEN, A. N., J. BJORNSON:
Heparinelimination in uraemic patients on haemo-
dialysis. Scand. J. Haematol.
17: 29 - 35 (1976)
- 81 TEIEN, A. N.:
Heparinelimination in patients with liver cirr-
hosis. Thrombos. Haemostas.
38: 701 - 705 (1977)
- 82 TEIEN, A. N., M. LIE, U. ABILDGAARD:
Assay of heparin in plasma using a chromogenic sub-
strate for activated factor X. Thrombos. Res.
8: 413 - 416 (1976)
- 83 THALER, E.:
Antithrombin III, Physiologie und klinische Be-
deutung. Die gelben Hefte.
XIX: 145 - 154 (1979)
- 84 THALER, E.:
In: Ergebnisse der Gastroenterologie.
Hrsg.: F. Stelzner, F. Wewalka, M. Classen. Gräfel-
fing.
156 (1976)
- 85 THOMAS, L.:
Labor und Diagnose. 2. Aufl. Marburg/Lahn: Medizi-
nische Verlagsgesellschaft.
469 - 471 (1984)
- 86 TRIPLETT, D. A.:
Heparin: Biochemistry, therapy and laboratory
monitoring. Therapeutic Drug Monitoring.
1: 173 - 197 (1979)
- 87 VINAZZER, H.:
Zur Bestimmung von Heparin im Plasma. Anaesthesist.
28: 299 - 303 (1979)
- 88 WENZEL, E., NIENHAUS, K. et al.:
Aussagekraft und Zuverlässigkeit laboranalytischer
Methoden zum Nachweis von Heparin. In: Kontrolle
von Antithrombotika. Hrsg.: R. Marx und H. A.
Thies, Basel-Grenzach Wyhlen: Editiones Roche.
47 - 70 (1981)
- 89 WITT, I.:
Overview on methods for the determination of
heparin. In: Heparin: New biochemical and medical
aspects. Berlin; New York: de Gruyter.
89 - 94 (1983)

Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Jean-Mario Pallast Balth.-Neumann Str.40,7520 Bruchsal
Geburtsdatum/-ort:	19. November 1953 in Karlsruhe
Familienstand:	verheiratet
Ausbildung und berufliche Entwicklung;	
1960 bis 1965:	Grundschule in Münzesheim
1965 bis 1968:	Realgymnasium in Fulda
1968 bis 1972:	Progymnasium Bad Wimpfen
1972 bis 1975:	Englisches Institut Heidelberg
1975:	Abitur
1975 bis 1976:	Absolvierung des Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr
1976:	Beginn einer dreijährigen Kranken- pflegeausbildung an der Kranken- pflegeschule des Krankenhauses Bruchsal
1977:	Abbruch der Ausbildung wegen Zuteilung eines Studienplatzes
Wintersemester 77/78:	Beginn des Medizinstudiums, LMU München bis November 1983
Frühjahr 1980:	Physikum
Frühjahr 1981:	1. Staatsexamen
Frühjahr 1983:	2. Staatsexamen
Wintersemester 83/84	Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg
Frühjahr 1984:	3. Staatsexamen
11. Mai 1984:	Erteilung der Approbation als Arzt
5. Oktober 1984:	Heirat mit Susanne Fröhlich

